

CAPÍTULO IX

Transportadores Mitocondriales: Estructura, Función y Patología

■ Antonio Montalvo¹ y Ferdinando Palmieri²

¹*Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina y Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria, Santander, España.* ²*Dipartimento Farmaco-Biologico, Facoltà di Farmacia, Università di Bari, Via Orabona 4, 70125 Bari, Italy. edicion@ranf.com*

RESUMEN

Los transportadores mitocondriales (MCs) son una superfamilia de proteínas de transporte secundario codificada en el núcleo. Catalizan el transporte de un conjunto de sustratos de diferentes naturaleza y tamaño de metabolitos, nucleótidos y coenzimas a través de la membrana mitocondrial interna (MMI). Estos transportadores están codificados en el hombre por los genes SLC25 con características de secuencia llamativas. Algunos MCs tienen isoformas codificadas por diferentes genes SLC25, mientras que excepcionalmente, sus variantes son debidas al resultado de un corte y empalme alternativo del gen. Los MCs estudiados hasta ahora, pertenecen a la misma familia de proteínas -excepto el transportador del piruvato- ya que presentan un número significativo de homologías estructurales y en consecuencia funcionales. La estructura funcional de los MCs es de monómeros; cada monómero está plegado en la membrana formando seis segmentos transmembrana. La importancia de los MCs se manifiesta por su amplia distribución en todos los eucariotas, su papel importante en numerosas vías metabólicas y funciones celulares, y la gravedad de las enfermedades causadas por alteraciones de sus genes.

INTRODUCCIÓN

En esta revisión, se destaca la información disponible, molecular, bioquímica, clínica y fisiopatología de enfermedades conocidas hasta el momento que están asociadas con defectos de los transportadores mitocondriales.

Las mitocondrias, son esenciales no sólo para las rutas metabólicas que tienen lugar en estos orgánulos, sino también para muchas otras que ocurren principalmente fuera de la matriz mitocondrial.

La mitocondria está formada por una membrana externa y una interna que delimita una matriz. Mientras que la membrana externa es permeable a los solutos con una masa molecular $\leq 4\text{-}5$ kDa, la membrana interna es muy impermeable.

Sólo algunas moléculas no cargadas, como O_2 y CO_2 difunden a través de ella.

El paso de los compuestos polares a través de la membrana mitocondrial interna es posible gracias a estar catalizado principalmente por una súper familia de proteínas conocidas como la MCF (Familia de MC (transportadores mitocondriales)) codificadas por el núcleo.

Los transportadores mitocondriales (MCs), son proteínas de membrana de 30-34 kDa codificadas habitualmente por el ADN nuclear, que transportan una gran variedad de solutos a través de la membrana mitocondrial interna (1, 2). Además de proporcionar un enlace entre los compartimentos mitocondriales y otros compartimentos celulares, los MCs juegan un papel importante en la regulación y el mantenimiento de un equilibrio entre citosol y la matriz mitocondrial, por ejemplo, de la fosforilación y de potenciales redox.

Algunos transportadores, o una de sus isoformas en su caso, se encuentran ampliamente distribuidos en todos o casi todos los tejidos, mientras que otros son específicos de tejido y su distribución limitada refleja su importancia en tejidos especiales, por ejemplo, para la biosíntesis de ácidos grasos o para la termogénesis.

Debido a la compartimentalización de los enzimas, muchos metabolitos producidos fuera de la mitocondria deben entrar, como es el caso de el ADP y fosfato (P_i) para la fosforilación oxidativa, los sustratos del ciclo del ácido tricarboxílico, la beta-oxidación de los ácidos grasos, la producción y reparación del ADN mitocondrial, ARN mitocondrial y síntesis proteica, y la degradación de aminoácidos, coproporfirinógeno III y hierro para la

biosíntesis del hemo, donantes de grupos (S-adenosilmetionina y ácido fólico) y coenzimas (NAD^+ , FAD, ThPP (pirofosfato de tiamina) y coenzima A). Asimismo, otros metabolitos producidos dentro de la matriz mitocondrial debe salir de los orgánulos, por ejemplo, el ATP, citrato, malato, fosfopiruvato, delta-aminolevulinato (el producto de la primera etapa en la biosíntesis del hemo), citrulina y cuerpos cetónicos (acetoacetato). Además de metabolitos, deben atravesar la membrana mitocondrial interna cationes tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ para regular la actividad enzimática y el volumen de las mitocondrias.

Las enfermedades mitocondriales, se expresan con multitud de diferentes fenotipos clínicos como consecuencia de los diferentes genotipos resultantes de mutaciones en los genes del millar de proteínas que forman las mitocondrias.

Clásicamente, se ha considerado esta patología mitocondrial como asociada a mutaciones en genes del propio ADN mitocondrial, que codifican 13 péptidos, 2 rARNs y 22 tARNs; al millar de genes en el ADN nuclear que codifican el resto de las proteínas funcionales de la mitocondria y a otros genes que codifican proteínas implicadas en la intercomunicación entre ambos genomas. Ambos genomas, codifican para proteínas esenciales en funciones importantes en la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa y sólo el nuclear para el metabolismo anfóbico mitocondrial. Quizás lo que más llame la atención es su diferente comportamiento genético. Los genes del ADN nuclear siguen una herencia bialélica mendeliana, los genes del ADN mitocondrial una herencia multialélica asociada a células y tejidos individualmente.

El comportamiento funcional de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa tan interdependiente de sus complejos y subunidades, produce muchas veces fenotipos con una clínica semejante. Diferentes mutaciones producen el mismo fenotipo o una única mutación expresiones clínicas muy diversas, especialmente en mutaciones que afectan el aparato de la síntesis proteica de los complejos de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. Alteraciones en genes nucleares implicados en la fosforilación oxidativa pueden inducir también alteraciones en el ADN mitocondrial y su expresión, siguiendo patrones mendelianos de herencia. Las enfermedades de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa también pueden ser causadas por mutaciones de genes del ADN nuclear que codifican las proteínas necesarias para:

a) la replicación, transcripción, traducción, mantenimiento y reparación del ADN mitocondrial,

- b) el funcionamiento de los complejos I-V (subunidades codificadas por el ADN nuclear) y su ensamblaje,
- c) la importación de los sustratos de la fosforilación oxidativa, y
- d) la importación, modificación e inserción de los cofactores de la cadena respiratoria, tales como heme, metales y grupos de hierro-azufre (Fe-S).

Las enfermedades de la fosforilación oxidativa dependientes del ADN mitocondrial (mtADN), se deben a reordenamientos a gran escala incluyendo deleciones y duplicaciones, que suelen ser esporádicos e invariablemente heteroplásmicas, o mutaciones puntuales que pueden ser heteroplásmicas u homoplásmicas y se transmiten por vía materna.

Las enfermedades de la fosforilación oxidativa dependientes del ADN nuclear, pueden inducir múltiples deleciones secundarias en el ADN mitocondrial o pérdida de éste en los tejidos afectados y seguir un patrón de herencia mendeliana.

Aunque la función principal de las mitocondrias es la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa, estos orgánulos desempeñan otros muchos papeles de enorme importancia. Contienen varias rutas metabólicas, tales como el ciclo del ácido cítrico. Son el principal sitio de generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Son fundamentales para ciertos procesos biológicos, tales como la señalización celular, la proliferación celular y muerte celular mediante necrosis o apoptosis. Algunas enzimas implicadas en la gestión de ROS, en el catabolismo de aminoácidos y en la biosíntesis de ácidos grasos, hormonas esteroides, colesterol, cadenas laterales de farnesilo y geranilo, cardiolipina, ubiquinol, hemo y urea se encuentran dentro de las mitocondrias.

Como consecuencia de mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales aparecen, entre otros, trastornos en proteínas implicadas en el ciclo del ácido cítrico (3), beta-oxidación de los ácidos grasos (4), metabolismo de la cardiolipina (síndrome de Barth) (5, 6), utilización del hierro (ataxia de Friedreich, ataxia ligada a X y la anemia sideroblástica) (7), defensa antioxidante (8), importación de proteínas (síndrome de distonía y sordera ligado al cromosoma X) (9), dinámica de la red mitocondrial (de fisión/fusión) (10) y transportadores de metabolitos mitocondriales. Además, algunos tipos de cáncer son causados por mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales (11, 12).

FAMILIA DE LOS TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES SLC25

Los transportadores mitocondriales (MCs), están codificados en el hombre por los genes SLC25 del ADN nuclear. Estos transportadores se localizan en la membrana interna de la mitocondria en la que se encuentran incluidos; con algunas excepciones en membranas de otros orgánulos como peroxisomas y cloroplastos. Catalizan la translocación de solutos a través de la membrana y los MCs estudiados hasta ahora, pertenecen a la misma familia de proteínas, la familia de los transportadores mitocondriales (MCF)-excepto el transportador del piruvato (109)- ya que presentan un número significativo de homologías estructurales y en consecuencia funcionales.

Las mitocondrias y el citosol realizan una importante cooperación entre gran número de procesos metabólicos celulares, para lo que es necesario un flujo continuo y muy diversificado de metabolitos, nucleótidos, y cofactores en ambos sentidos, hacia el interior y exterior de la mitocondria, a través de la barrera de permeabilidad de la membrana mitocondrial interna (MMI).

Estudios funcionales en mitocondrias intactas han indicado la presencia de alrededor de 20 sistemas para el transporte de metabolitos involucrados en la fosforilación oxidativa, ciclo del ácido cítrico, oxidación de ácidos grasos, gluconeogénesis, lipogénesis, transferencia de equivalentes reductores, síntesis de urea, degradación de aminoácidos, ADN, ARNs y proteínas intramitocondrial y otras funciones entre el citosol y las mitocondrias.

Desde 1982, en que se determinó la secuencia de aminoácidos del transportador ADP/ATP hasta 1997, sólo seis MCs, tras su purificación a partir de mitocondrias, habían sido secuenciados mediante degradación de Edman o por técnicas de biología molecular basadas en la información de secuencia de la proteína (15).

En la era post-genómica, la búsqueda en bases de datos del genoma con las características de la secuencia de la MCF ha puesto de manifiesto la existencia de un gran número de miembros en esta familia en todos los eucariotes (56 en el hombre, 35 en *S. Cerevisiae* y 58 en *Arabidopsis Thaliana*) (20).

El primer paso para elucidar la función transportadora es descubrir el/los substrato(s) transportado(s) por un transportador en particular.

Uno de los métodos más eficaces para identificar la especificidad de sustrato de nuevos MCs, consiste en la expresión génica en *E.coli* y/o *S.cerevisiae*, la purificación de los productos génicos y su reconstitución en liposomas en los que se ensayan los sustratos que se transportan por medidas directas (49).

La elección del sustrato a probar se realiza orientándose en base a la agrupación filogenética, información genética, conocimiento del metabolismo celular y la complementación de fenotipos en MCs, confirmándose los sustratos por ensayos de transporte. Unas 25 funciones de transporte ya han sido evidenciadas (Tabla 1 del Anexo).

Los MCs pueden dividirse en subfamilias en base a su especificidad por el sustrato (Tabla 2). Con frecuencia, diferentes subfamilias presentan una superposición de sustratos transportados. Es importante recordar que el sustrato mejor transportado en liposomas reconstituidos puede no ser el sustrato más importante en condiciones fisiológicas y/o patológicas, e incluso en diferentes tejidos o células especializadas. Algunos transportadores también podrían transportar sustratos adicionales aún no probados.

La mayoría de las subfamilias indicadas anteriormente están presentes en todos los eucariotas. Unas pocas subfamilias son más específicas, p.ej. genes ortólogos del transportador de GTP/GDP de levaduras no están presentes en mamíferos o plantas (13) lo que puede ser un buen objetivo para nuevos fármacos eficaces contra hongos y/o protistas patógenos del Homo sapiens (p.ej. *Candida albicans* y *Leishmania chagasi*).

Es importante, para desentrañar el papel fisiológico de los MCs considerar su localización subcelular (p.ej. MCs en peroxisomas); distribución en tejidos; parámetros cinéticos; distribución de metabolitos en diferentes compartimentos celulares, y análisis fenotípico de organismos o líneas celulares en las que se ha generado un gen knocked out/knocked down o sobreexpresado un determinado gen de un transportador.

Estructura

Los MCs pertenecen a la MCF; son proteínas pequeñas con una masa molecular aproximada de 30-34 kDa (Figura 1). Todos los miembros de la MCF con función conocida muestran una estructura tripartita que consiste en tres dominios repetidos en tándem de unos 100 aminoácidos de longitud. Sólo, dos subfamilias, los transportadores de aspartato/glutamato y de ATP-Mg/Pi, que comparten propiedades de unión al Ca^{2+} , tienen una estructura peculiar que consiste en dos dominios: un dominio C-terminal o región catalizadora, que contiene todas las características de la MCF, y un dominio N-terminal

Tabla 2.- Subfamilias de MCs identificadas en base a su especificidad de sustrato

Los sustratos transportados por cada subfamilia de transportadores se identificaron en liposomas reconstituidos con la proteína recombinante, salvo alguna excepción..

MC: transportador mitocondrial; **CoA:** Coenzima-A; **dNDP:** deoxinucleósido difosfato; **dNTP:** deoxinucleósido trifosfato; **AG:** ácidos grasos; **PAP:** adenosina 3',5'-difosfato; **Pi,** fosfato; **SAM:** S-adenosilmetionina; **ThMP:** monofosfato de tiamina; **ThPP:** pirofosfato de tiamina; **UCP:** proteína desacoplante.

Subfamilias de MC	Principales sustratos	Principales funciones metabólicas
Para nucleótidos/dinucleótidos		
ADP/ATP	ADP/ATP	Fosforilación Oxidativa
CoA/PAP	CoA, PAP, defosfo-CoA, ADP, ATP	Ciclo de Krebs, b-oxidación de AG, biosíntesis de heme, catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, síntesis de acetilglutamato, acetilación de proteínas, Ácido graso sintasa mitocondrial
ATP-Mg/Pi	ATP-Mg, Pi, ADP, AMP	Modulación del contenido de nucleótidos de adenina en la matriz, regulación enzimática
ThPP	ThPP, ThMP, dNDP, dNTP, ADP, ATP	
Nucleótidos de pirimidina	(desoxi)nucleótidos de pirimidina	Síntesis y catabolismo de DNA y RNA mitocondriales
Folato/FAD	Folatos, FAD	Dona unidades monocarbonadas, reacciones redox
Nucleótidos de adenina en peroxisomas	ATP, ADP, AMP	b-oxidación de AG peroxisomal
NAD ⁺	NAD ⁺ , d(AMP), (d)GMP	Reacciones redox, balance redox en mitocondrias.
GTP/GDP	GTP, GDP, dGTP, dGDP	Síntesis de RNA y proteínas mitocondriales, replicación y reparación de DNA mitocondrial
Para di/tri-carboxilatos y oxoácidos		
Citrato	Citrato, malato, isocitrato, <i>cis</i> -aconitato, fosfoenolpiruvato,	Biosíntesis de AG y esteroides, gluconeogénesis a partir de lactato, lanzadera isocitrato/oxoglutarato.
Dicarboxilato	Malato, succinato, Pi, sulfato, tiosulfato	Ciclo de Krebs, gluconeogénesis a partir de piruvato,, síntesis de urea, metabolismo de azufre.
Succinato/fumarato	Succinato, fumarato	Gluconeogénesis
Oxoglutarato	Oxoglutarato, malato	Lanzadera malato/aspartato, lanzadera isocitrato/oxoglutarato, metabolismo de nitrógeno.
Oxodicarboxilatos	Oxoalacato, oxoglutarato	Catabolismo de triptófano y lisina y síntesis en levaduras
Oxalacetato/sulfato	Oxalacetato, sulfato, tiosulfato, a-isopropilmalato	Ciclo de Krebs, metabolismo de azufre, transferencia de equivalentes de reducción, síntesis de leucina en levaduras.
Para Aminoácidos y otros sustratos		
Glutamato	L-Glutamato	Síntesis de urea, degradación de aminoácidos
Aspartato/glutamato	Aspartato, glutamato, sulfinato de cisteína	Lanzadera malato/aspartato, síntesis de la urea, gluconeogénesis, degradación de cisteína
Ornitina	Ornitina, citrulina, lisina, arginina (histidina)	Síntesis de urea, metabolismo de aminoácidos básicos, biosíntesis de poliaminas
Carnitina	Carnitina, acilcarnitinas	b-oxidación de AG
SAM	SAM, S-adenosilhomocisteína	Metilación de proteínas, RNA y DNA mitocondriales
UCP	H ⁺	Termogénesis

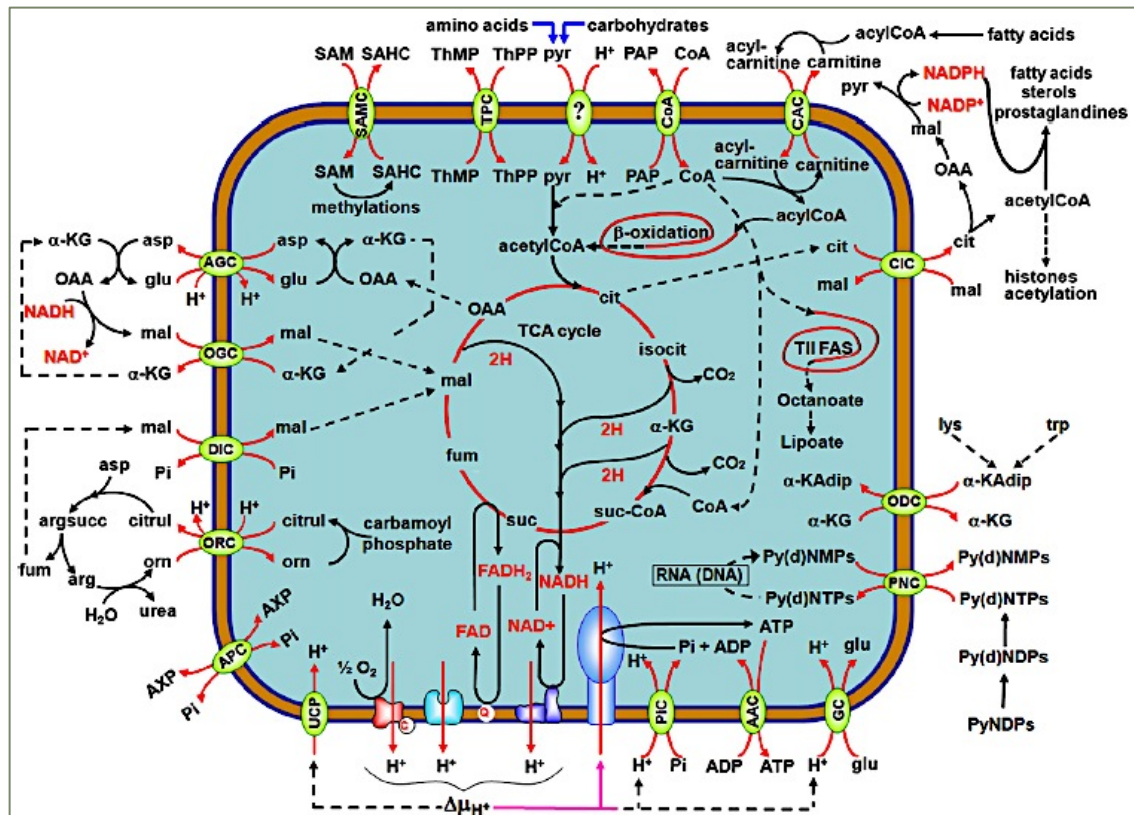


Figura 1.- Funciones metabólicas de los MCs

AAC, transportador de ADP/ATP; AGC, transportador de aspartato glutamato; APC, transportador ATP-Mg/Pi; CAC, transportador carnitina-acilcarnitina; CIC, transportador de citrato (tricarboxilato); CoA, transportador de coenzima A; DIC, transportador de dicarboxilato; GC, transportador de glutamato; ODC, transportador de oxoadipato; OGC, transportador de oxoglutarato; ORC, transportador de ornitina; PiC, transportador de fosfato; PNC, transportador de pirimidin nucleótidos; SAMC, transportador de S-adenosilmetionina; TPC, transportador de pirofosfato de tiamina, UCP, proteína desacoplante. (de F.Palmieri: Molecular Aspects of Medicine: (2012) en prensa).

extenso o porción reguladora (con más de 150 aminoácidos), que contiene tres o cuatro motivos de unión al Ca^{2+} .

El esquema de la Figura 1, muestra los 16 MCs funcionalmente identificados que catalizan el transporte de metabolitos, nucleótidos o coenzimas a través de la membrana mitocondrial interna. Estos Transportadores están involucrados, con superposición parcial, en: la fosforilación oxidativa (AAC, PiC, UCP), vías de oxidación/reducción (AGC, OGC, DIC, CIC, CAC); síntesis y degradación de Adn y Arn mitocondrial (PNC); homeostasis del “pool” intramitocondrial de nucleótidos de adenina (APC); metilación del ADN mitocondrial, ARN mitocondrial y algunas proteínas intramitocondriales (SAMC), importación de pirofosfato de tiamina (ThPP) necesario para la actividad de los complejos piruvato y oxoglutarato deshidrogenasas (TPC); importación del coenzima A (CoA) necesario para la β -oxidación de los ácidos grasos (FA), ciclo de Krebs, y biosíntesis del heme, catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, ciclo de la urea y FA sintasa mitocondrial tipo II (transportador de CoA), y metabolismo de aminoácidos (AGC, ORC, GC, ODC). El esquema no incluye todos los transportadores de la Tabla 1 (Anexo) y no muestra todas las vías metabólicas en las que los transportadores ya identificados están implicados.

De acuerdo con esta estructura, cada una de las tres repeticiones que forman los MCs se pliegan en dos hélices alfa que abarcan la membrana formando una estructura con un total de seis hélices alfa (14, 15). Los extremos N y C están expuestos a la cara citosólica de la membrana; los bucles que conectan los dos alfa-hélices de cada repetición se encuentra en el lado de la matriz; y los dos segmentos más cortos que conectan las tres repeticiones están en el lado citosólico (16, 17).

En 2003, se determinó la estructura 3D de un miembro de la MCF, el transportador ADP/ATP formando complejo con su inhibidor carboxiatractilósido (18).

Esta estructura consta de una a seis alfa-hélices transmembrana (H1-H6) y tres alfa-hélices cortas (h_{12} , h_{34} y h_{56}) paralelas al plano de membrana en el lado de la matriz.

Las seis alfa-hélices transmembrana, en orden de 1 a 6, revisten una cavidad en forma de embudo abierta hacia el citosol en sentido antihorario (Figura 2). En cada dominio repetido, la primera parte del motivo característico, PX(D/E)XX(R/K), está situada en el extremo C-terminal de las alfa-hélices transmembrana de número impar, mientras que la segunda parte, (D/E)GXXXX(W/Y/F)(R/K)T, está situada en el extremo N-terminal de las alfa-hélices transmembrana de número par.

Las prolinas del motivo característico PX(D/E)XX(R/K) forman bruscamente una vuelta en las alfa-hélices transmembrana impares, y los residuos cargados de los tres

motivos característicos forman una red de puentes salinos que cierra la cavidad (ocupada por el inhibidor) en el lado de la matriz.

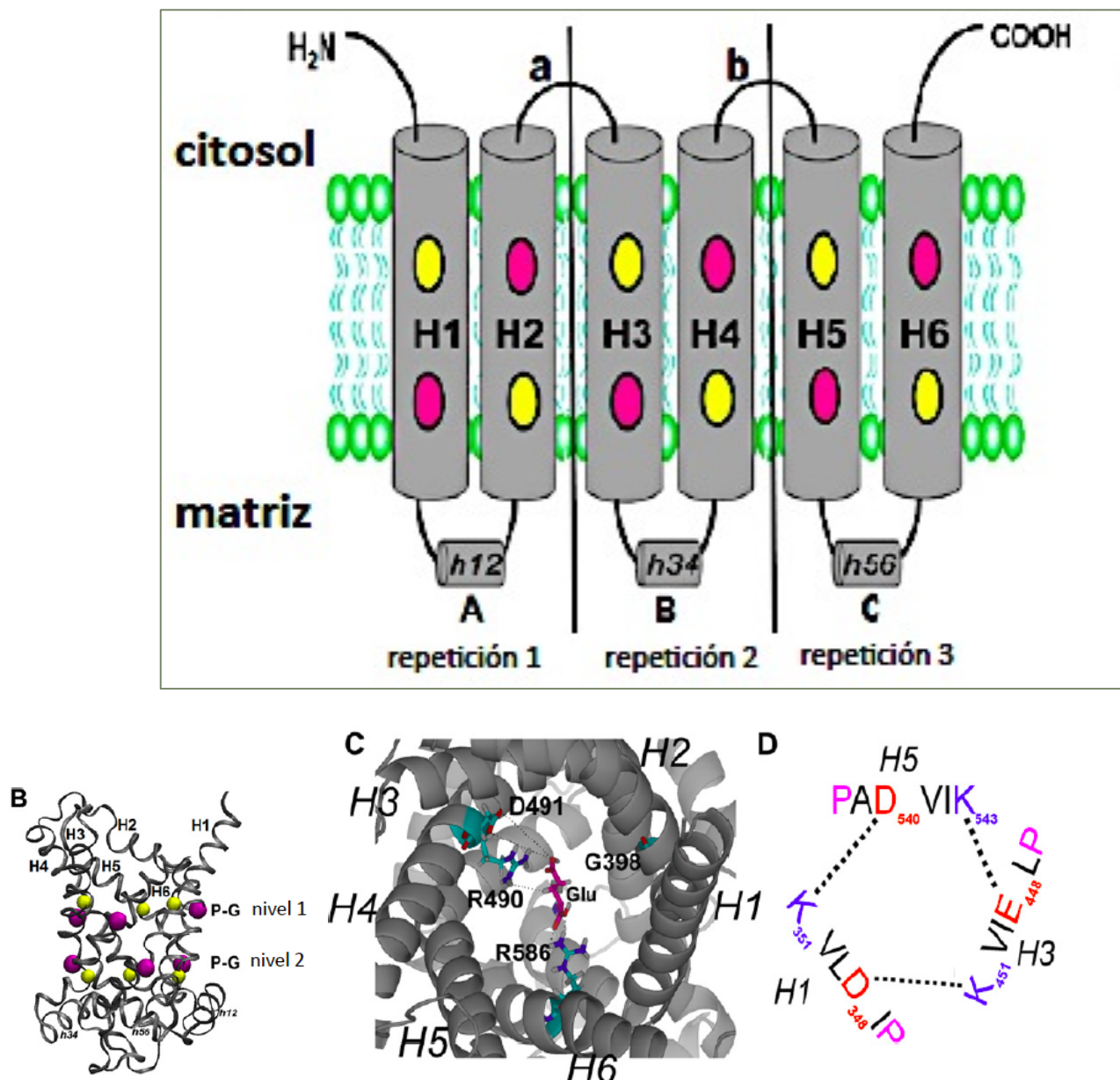


Figura 2.- Propiedades estructurales de los MCs

(A) Modelo topológico de los MCs. La secuencia se divide en tres dominios similares, cada uno con dos α -hélices transmembrana. Dentro de cada dominio las dos hélices están conectadas por bucles largos en la matriz (A, B y C), mientras que los dominios están conectados por bucles más cortos en el citosol (a y b). Además, las prolina y glicinas conservadas en cada α -hélice transmembrana se indican con óvalos rojos y amarillos, respectivamente.

(B) Vista lateral del modelo estructural comparado del transportador aspartato glutamato humano isoforma 1 (AGC1) resaltando la posición de las prolina (P) y glicinas (G) conservadas en las hélices α transmembrana pares e impares. El triplete de PPP de las hélices pares e impares son de color morado, el triplete GGG de las hélices pares e impares están en amarillo. El modelo estructural de AGC1 se construyó usando la estructura 3D del transportador bovino ADP/ATP como molde o plantilla. **(C)** Vista superior desde el lado citosólico del modelo estructural comparado del AGC1 humano señalando el sitio de unión del sustrato al transportador. En la imagen se muestran los residuos G398, R490, D491 y R586 de las α -hélices transmembrana de número par que sobresalen en la cavidad a la altura del sitio de unión y el sustrato glutamato con varillas de color azul. Se destacan las posibles interacciones entre el sustrato y los residuos R490, D491 y R586. **(D)** Red de puente salino en la matriz que constituye la compuerta de los MCs en la matriz. Los puentes de sal están formados por los residuos positivos y negativos de los motivos característicos PX (DE) XX (RK) situados en el extremo C-terminal de las tres hélices α transmembrana impares. Esta compuerta de cierre de la cavidad transportadora en el lado de la matriz se explica mediante la estructura 3D del transportador ADP/ATP inhibido por carboxiatractilósido. (de F.Palmieri: Molecular Aspects of Medicine: (2012) en prensa).

Es muy probable, que esta estructura del transportador ADP/ATP con carboxiatractilósido represente el plegamiento común de todos los otros miembros de la MCF y por ello ha sido utilizado como una plantilla para la construcción de modelos de homología de distintos transportadores. Además, la red de par iónico mencionada anteriormente, constituye la puerta de los MCs en el lado de la matriz. La estructura cristalina del complejo transportador ADP/ATP-carboxiatractilósido ha demostrado datos anteriores e hipótesis, es decir, que la red mencionada anteriormente constituye la puerta cerrada de los MCs en estado “c” (citosólico) (19); que los transportadores poseen una cierta pseudosimetría triple basándose en que la secuencia se repite tres veces (14); en observaciones de microscopía electrónica (21) y en que muestran seis alfa-hélices transmembrana con los extremos N y C terminales expuestos hacia el lado citosólico de la membrana (16 y las referencias en él). Las dificultades en la cristalización de MCs no inhibidos han impedido avanzar en la definición de su estructura y, en particular, su conformación en estado “m” (matriz). Sin embargo, se han obtenido recientemente resultados importantes mediante análisis de alineación de secuencias múltiples de MCs de función conocida (especificidad de sustrato) como una extensión del primer y fundamental

descubrimiento del motivo característico repetido tres veces en la estructura primaria del transportador ADP/ATP (14) y (16).

Estudios basados en análisis de la secuencia de alineación

El conocimiento de la especificidad por el sustrato de los miembros de la MCF y la identificación de subfamilias han sido empleados para analizar múltiples alineamientos de secuencias de MCs en tres niveles diferentes: secuencias completas, secuencias de las tres repeticiones y secuencias de las alfa-hélices transmembrana. Este tipo de análisis ha aportado una información bastante útil. Considerando los aminoácidos conservados en las alineaciones de los transportadores, con especificidad por un sustrato conocido y el uso de modelos comparativos de estos transportadores, Robinson y Kunji (24) propusieron un "sitio de unión a sustrato común" en los MCs, es decir, un sitio de unión a sustrato con una localización similar. Este sitio, está formado por los residuos de los tres pares de alfa-hélices transmembrana que sobresalen en la cavidad del transportador en el punto medio de la membrana a un giro y medio de hélice por encima de la red de puente salino de la matriz que cierra el fondo de la cavidad. Entre los tres puntos de contacto antes propuestos, el punto II en la hélice 4 es el más importante porque es el único capaz de discriminar entre aminoácidos (punto II representado por R(D/E)), ácidos carboxílicos (incluyendo cetoácidos) (R(QHNTAV)) y nucleótidos (G(IVLMT)). Hay algunas excepciones en el punto II en los transportadores ORC2, Pi y GTP/GDP. Datos recientes, indican que residuos de alfa-hélices de número impar transmembrana que sobresalen dentro de la cavidad en el nivel de puntos de contacto I, II y III también pueden participar en la unión del sustrato.

El análisis de alineamientos de secuencias múltiples inter-repetitivas de MCs de función conocida (especificidad de sustrato), muestran tripletes (formados por los residuos alineados de cada portador), que pueden ser simétricos (tres aminoácidos idénticos), o asimétricos (diferentes aminoácidos) (25). Los tripletes muy simétricos y conservados son importantes para la estructura y/o mecanismo de transporte, mientras que los tripletes asimétricos lo son para el reconocimiento y/o unión del sustrato (que normalmente tiene una distribución asimétrica de los grupos funcionales). Típicos tripletes asimétricos (80 y 81) corresponden a los dos aminoácidos que están situados en puntos de contacto I, II y III. Tripletes simétricos típicos (30 y 33) implican a los residuos de carga positiva y negativa que participan en la red de puente salino de la matriz (18). Otros tripletes simétricos, aunque menos conservados (tripletes 93 y 96), están localizados en el extremo C-terminal de las alfa-hélices pares transmembrana y se ha propuesto que formen una red de puente salino en el

lado citosólico. Esta red de pares de iones cerraría el transportador en el estado "m" (matriz) (25) y por lo tanto, constituyen la puerta del MC en el lado citosólico.

Al considerar los tripletes en base a la especificidad por el sustrato, es evidente que subfamilias de MCs se caracterizan por tripletes específicos que sobresalen en la cavidad del transportador (20, 26, 60). Estos tripletes por lo tanto, se puede utilizar para predecir la función (especificidad de sustrato) de portadores aún no identificados. No obstante, (i) algunos de los tripletes característicos son compartidos por más de una subfamilia, (ii) varias subfamilias se caracterizan por más de tres tripletes.

La alineación de secuencias múltiples interhélices mostró la presencia de residuos de prolina y glicina bien conservados, tanto en las alfa-hélices transmembrana de número par como impar (tripletes 28 y 83 de prolina y 19 y 28 de glicina). Los restos de prolina y de glicina de las hélices se alinean con los residuos de prolina y glicina de las hélices impares de una manera antiparalela (Figura 3). Destaca que tanto en las hélices pares como impares como impares, una prolina o un residuo de glicina se encuentran por encima (a una vuelta de hélice) y por debajo (a media vuelta de hélice) de los residuos del sitio común de unión al sustrato.

Además, los residuos de prolina de las hélices impares y los residuos de prolina de las hélices pares están situados por encima (a media vuelta de hélice) de la matriz y por debajo (a dos vueltas y media de hélice) de la puerta citosólica. Se ha propuesto que los residuos de glicina y de prolina de las hélices pares y los residuos de glicina de las hélices impares actuarían como bisagras para abrir o cerrar el transportador en el lado de la matriz o en el lado citosólico (26), de forma análoga a lo que se ha afirmado para los residuos de prolina de las hélices impares (18).

Es interesante considerar que, los restos antes mencionados G y P de las hélices impares están alineados con el G y P de las hélices pares, lo que refleja una disposición antiparalela de hélices pares e impares (Figura. 3, panel B). La P de las hélices impares y la G de las hélices pares se encuentran a un giro y medio de hélice por debajo del sitio de unión del sustrato, y la G de las hélices impares y la P de las hélices pares a un giro y medio de hélice por encima del sitio de unión a sustrato. Además, la P de las hélices impares está a un giro y medio de hélice por encima de la red de pares de iones de la matriz o compuerta de la matriz, mientras que el P de las hélices pares está a dos vueltas y media de hélice por debajo de la red de pares de iones citosólica o puerta citosólica. Según lo propuesto para las P de las hélices impares (18), se propone que la G de las hélices impares y la G y P de las

hélices pares también pueden actuar como bisagras para abrir o cerrar el transportador en el lado de la matriz o en el lado citosólico.









Transport mode		Driving force	Mitochondrial carrier
	cytosol  matrix		
uniport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_c]}{[S_m]} \right)$	carnitine / acylcarnitine
symport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_c^-]}{[S_m^-]} \right) + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH$	glutamate, phosphate
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_m^+]}{[S_c^+]} \right) + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH$	ornithine / H ⁺ (in yeast)
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \log \left(\frac{[S_{1c}^{2-}][S_{2m}^{2-}]}{[S_{1m}^{2-}][S_{2c}^{2-}]} \right)$	oxoglutarate / malate
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \left[\log \left(\frac{[S_{1c}^{3-}][S_{2m}^{4-}]}{[S_{1m}^{3-}][S_{2c}^{4-}]} \right) \right] + \Delta \Psi$	ADP / ATP
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \left[\log \left(\frac{[S_{1c}^-][S_{2m}^-]}{[S_{1m}^-][S_{2c}^-]} \right) \right] + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH + \Delta \Psi$	aspartate / glutamate
antiport		$2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \left[\log \left(\frac{[S_{1c}^{4-}][S_{2m}^{3-}]}{[S_{1m}^{4-}][S_{2c}^{3-}]} \right) \right] + 2.3 \left(\frac{RT}{F} \right) \Delta pH$	GTP / GDP

Figura 3.- Modos de transporte y sus fuerzas motrices catalizados por los MCs (F.Palmieri: Molecular Aspects of Medicine: (2012) en prensa)

Estudios de relación estructura-función en proteínas mutadas

Estudios de mutagénesis dirigida al sitio en el transportador de oxoglutarato (OGC) y otros MCs (23), (27-36), (106), (107) así como las mutaciones que ocurren naturalmente en MCs de pacientes (ver (37) para una revisión), interpretados mediante modelos comparativos sobre la base de la estructura tridimensional del transportador ADP/ATP muestran entre otras, las siguientes alteraciones:

- Los residuos que interaccionan con la bicapa lipídica, toleran su sustitución con cisteína salvo pocas excepciones.

- Pocos residuos que participen en las interacciones inter-helicoidales inhiben de forma significativa la actividad de transporte cuando se sustituyen. Estos residuos pueden desempeñar un papel en la estabilización del haz alfa-helicoidal, al sufrir los transportadores cambios conformacionales.

- Muchas sustituciones de residuos en la cavidad del transportador afectan a la actividad de transporte. Son importantes para la función los residuos de alfa-hélices pares e impares transmembrana. Los residuos cargados en la parte inferior de la cavidad, que pertenecen al motivo característico PX(D/E)XX(K/R) que sobresalen dentro de la cavidad a la altura del sitio de unión a sustrato, son críticos para la función, debido a que su sustitución puede interferir con la unión.

Hay otros residuos que sobresalen dentro de la cavidad que no pueden ser mutados o modificados sin una pérdida significativa en la actividad de transporte. Estos residuos, situados uno, tres y sobretodo dos vueltas de hélice por encima del sitio de unión del sustrato y generalmente perteneciendo más a las hélices pares que a las hélices impares (según los datos disponibles), también pueden desempeñar un papel en el reconocimiento del sustrato o de enlace.

La importancia de los residuos P y G de las hélices, se pone de manifiesto por mutagénesis dirigida al sitio. Los residuos G32, G130, G230, P41, P139 y P239 en hélices impares, así como los residuos G83, G87 y el G183 (pero no G281) en hélices pares transformados en cisteína afectan gravemente a la actividad de transporte de oxoglutarato. El transportador OGC es el único MC en el que sus residuos han sido todos mutados en cisteína y otros aminoácidos.

Modos de transporte y fuerzas motrices

Los MCs transportan metabolitos a través de la membrana mitocondrial interna de forma muy controlada, aspecto esencial para el gradiente de potencial electroquímico de H^+ (generado por la cadena respiratoria). Muchas subfamilias MC catalizan un intercambio obligatorio entre sustratos 1:1 en una reacción de antiporte (Figura 4). Algunos realizan un transporte de sustrato unidireccional (uniporte) como modo exclusivo de transporte (p.ej. transporte de H^+ por la UCP (proteína desacoplante)) y otros un uniporte lento además de antiporte (por ejemplo, el transportador de carnitina/acilcarnitina).

En cuanto a la naturaleza eléctrica de sus reacciones de transporte, los MCs son bien electroforéticos (electrógenicos) o electroneutros. Hasta la fecha, tres subfamilias bien caracterizadas son electroforéticas.

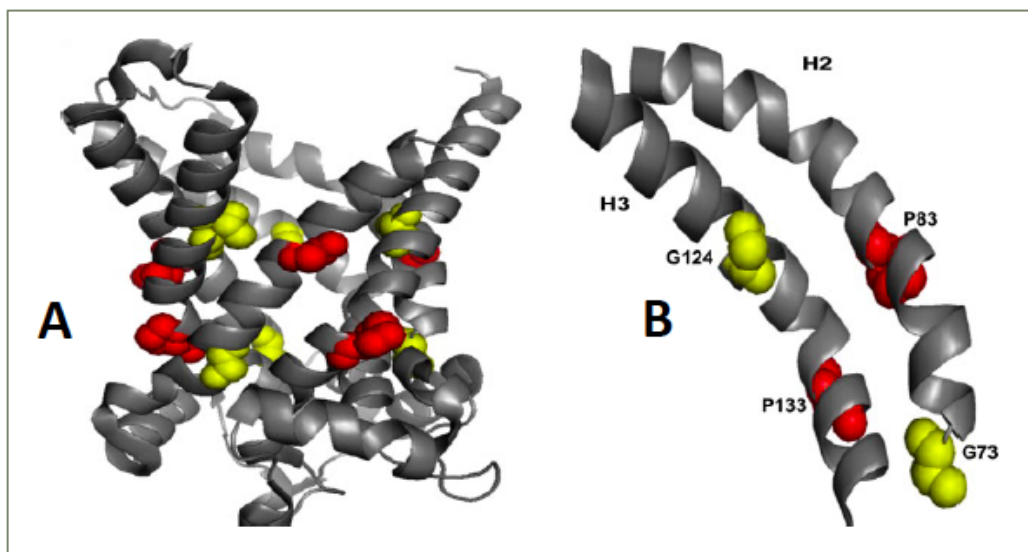


Figura 4.- Prolinas y Glicinas en las alfa-hélices pares e impares transmembrana de los MCs

Panel A: Vista lateral de la estructura 3D del transportador ADP/ATP (no se muestra el carboxiatractilósido). El triplete vertical PPP de las hélices impares y el triplete vertical PIG de las hélices pares están en rojo en la representación; el triplete vertical GGG de las hélices pares y el triplete vertical AGT de las hélices impares son de color amarillo.

Panel B: alfa-hélices transmembrana H2 y H3 de la estructura cristalina del transportador ADP/ATP. H2 y H3 se representan para mostrar la posición de P (rojo) y G (amarillo) en cada una, así como la curvatura de la hélice en H2 y H3. Las hélices H2 y H3 se han seleccionado debido a que no se superponen. (Modificado de F.Palmieri, C.L.Pierri: FEBS Letters: 584, (2010) 1931-1939).

Las subfamilias de los transportadores de ADP/ATP y el de aspartato/glutamato, catalizan el intercambio a través de la membrana mitocondrial interna generando desequilibrios de carga, ya que transporta ADP^{3-} por ATP^{4-} y glutamato $^-$ más un H^+ por aspartato $^-$, respectivamente. La tercera subfamilia, es la de la UCP mencionada anteriormente. El equilibrio electroneutro puede lograrse mediante cotransporte (simporte) y contratransporte de solutos y por uniporte de metabolitos eléctricamente neutros. En algunos casos, la electroneutralidad se mantiene por el movimiento simultáneo de H^+ mediado por el transportador. Las subfamilias de transportadores para Pi y glutamato, y en la levadura para oxaloacetato, median el transporte de aniones junto con una cantidad equivalente de H^+ (simporte anión/ H^+). Además, el transportador de ornitina humano puede transportar ornitina $^+$ a cambio de citrulina más un H^+ ; el transportador de GTP/GDP de levadura intercambia GTP^{4-} mas un H^+ por GDP^{3-} , y el transportador del tricarboxilato (citrato) citrato $^{2-}$ mas un H^+ por malato $^{2-}$. Otras subfamilias, catalizan un intercambio de aniones o cationes. El transportador de oxoglutarato, p.ej. intercambia oxoglutarato $^{2-}$ por malato $^{2-}$ y el transportador de ornitina ornitina $^+$ por lisina $^+$, arginina $^+$ o un H^+ .

Los MCs, utilizan el gradiente de concentración de los solutos y/o la fuerza protón motriz del gradiente potencial electroquímico de H^+ a través de la membrana mitocondrial interna. Debido a que el componente eléctrico de la fuerza protonmotriz es bastante alto, la naturaleza eléctrica de los transportadores de ADP/ATP y aspartato/glutamato proporciona un medio poderoso de expulsar ATP^{4-} y aspartato $^-$ contra el gradiente de concentración de la matriz mitocondrial al citosol. En el caso de simporte de H^+ o de intercambio de H^+ ; el gradiente de pH transmembrana regula la distribución de solutos aniónicos y catiónicos través de la membrana. Por ejemplo, con un pH más alto en el interior, la captación de Pi o Pi^{2-} compensada por H^+ mediada por el transportador (PiC); o de glutamato $^-$ (por el transportador de glutamato) está estimulada, como también lo está el flujo de salida de solutos catiónicos como en la exportación de ornitina $^+$ a cambio de un H^+ (por el transportador de ornitina de *S. cerevisiae*)

Mecanismo de transporte

Los MCs poseen una cavidad central, en la que el sustrato está ligado, y dos puertas de apertura y cierre alternativo en el lado citosólico o la matriz, como se representa esquemáticamente en la Figura 5.

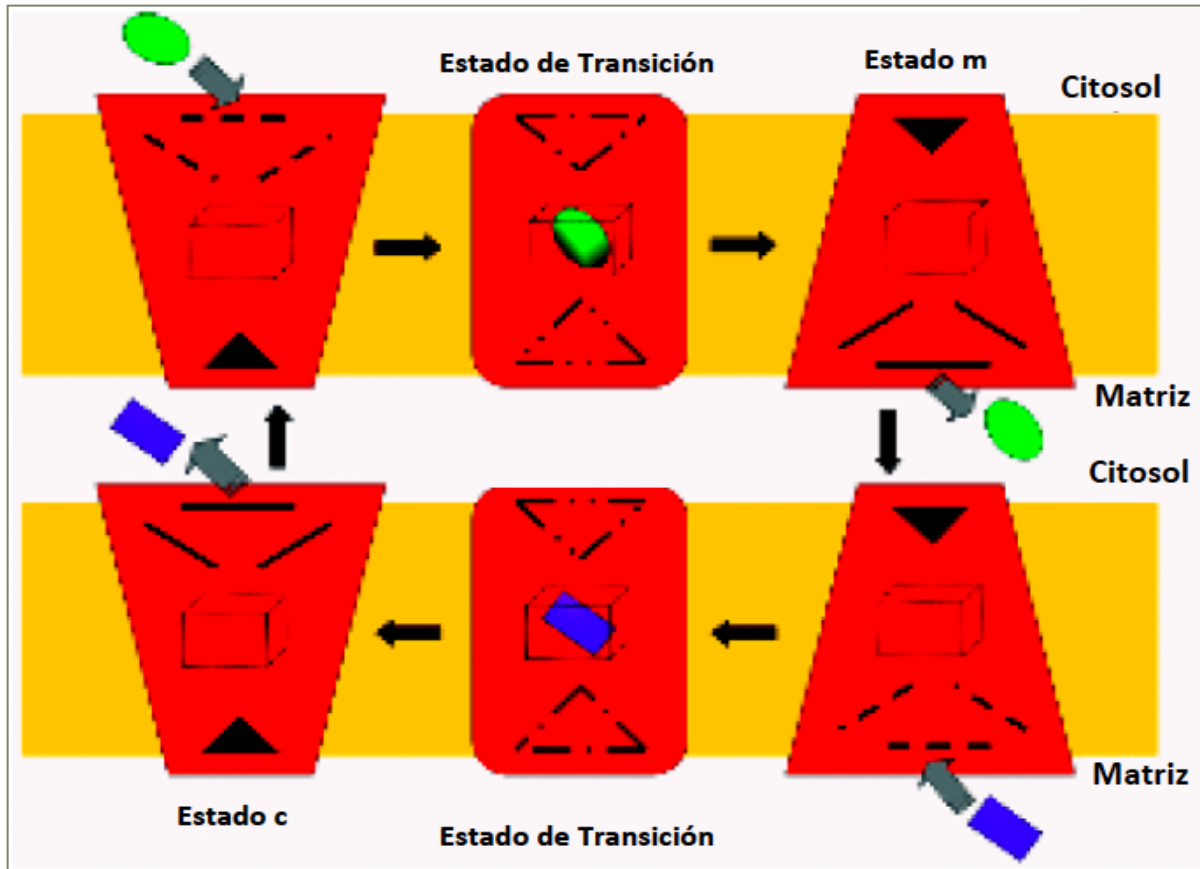


Figura 5.- Representación esquemática de la transición del estado-c al estado-m, y viceversa, que tiene lugar en los MCs en el ciclo de intercambio de transporte catalítico

Los trapezoides (lado izquierdo) ilustran el estado C después de la liberación del sustrato hacia el citosol (parte inferior), e inmediatamente después de la entrada del sustrato desde el lado citosólico (arriba); los trapezoides (lado derecho) muestra el estado-m después de la liberación del sustrato en la matriz (parte superior) e inmediatamente después de la entrada del sustrato desde el lado de la matriz (parte inferior). Los dos rectángulos redondeados centrales representan los estados de transición del transportador con el sustrato unido entrando desde el citosol (parte superior) y desde la matriz (parte inferior). La caja en el centro del transportador indica la "presencia" de una cavidad interna sin hacer referencia a su forma (que varía en los diferentes estados representados). Óvalos verdes y rectángulos azules oscuros representan el sustrato entrando desde el citosol y desde la matriz, respectivamente; triángulos sólidos indican puertas cerradas, y triángulos de puntos compuertas cerradas parcialmente/abiertas. (Modificado de F.Palmieri, C.L.Pierri: Essays Biochem, 47, (2010), 37-52).

Esta hipótesis, presenta como idea principal la presencia de un solo sitio de unión al transportador (en la cavidad) que está abierto como alternativa a los dos lados opuestos de la membrana. De acuerdo con este mecanismo, denominado "mecanismo de apertura del poro con un solo centro de unión" (38), la unión del sustrato en un lado induce cambios estructurales en el transportador reorientando el sitio de unión en el lado opuesto. El sustrato ahora abandona el sitio de transporte permitiendo que otro sustrato se una y sea transportado en la dirección opuesta.

Cuando la puerta de la matriz se cierra y la puerta *c* -citósólica- se abre (estado *c*), el sustrato se libera hacia el citosol y entra otro sustrato. A medida que el sustrato se une al transportador, la proteína se reorganiza hasta el estado de transición en el que se alcanza un máximo de interacciones entre la proteína y el sustrato, de acuerdo con el "ajuste de transición inducida de la catálisis del transportador (39).

En el estado de transición:

- (i) el sustrato se une en el centro del transportador a los residuos situados en el sitio de unión común y a los demás por encima y por debajo, de acuerdo con su tamaño y forma,
- (ii) el transportador está casi completamente cerrado a cada lado de la membrana (Figura 5).

La energía de enlace de las interacciones óptimas de ajuste entre el transportador y el sustrato en el estado de transición desencadena cambios estructurales adicionales que llevan a la conformación de matriz (en la que la puerta *c* se cierra y la puerta *m* se abre). En esta etapa el sustrato, que entró en el transportador desde el lado citosólico, sale a la matriz y el ciclo continúa con la entrada de otro sustrato procedente de la matriz (Figura 5).

En resumen, durante la transición del estado *c* al *m*, en el lado de la matriz las hélices transmembrana pares e impares se separan y se quiebra la puerta de la matriz; en el lado citosólico las hélices se unen para cerrar la puerta *c*. Lo contrario ocurre durante la transición del estado *m* al *c*. Los cambios conformacionales que ocurren durante la transición del estado *c* al estado *m*, y viceversa son aún desconocidos.

Recientemente, hemos propuesto que los cambios conformacionales son causadas por una inclinación de las hélices pares e impares y por la capacidad de los residuos de prolina y glicina de ambas hélices pares e impares para doblar o girar hacia el eje de la cavidad (26).

Este mecanismo, fue sugerido por primera vez para el transportador de ADP/ATP debido a la existencia de ligandos inhibidores de alta afinidad que se unen al transportador bien en el lado citosólico (atractilósido) o en el lado de la matriz (bongkrekatol). Estos ligandos eliminan el ADP o el ATP y su unión es mutuamente exclusiva, lo que indica un único sitio de unión reorientable. La existencia de un estado c ha sido demostrada por la estructura cristalina del complejo transportador ADP/ATP-carboxiatractilósido (18). Además, la reorientación del sitio de unión es apoyada por el "sitio de unión a sustrato común" (24) y por la cinética con un mecanismo "ping-pong" catalizada por el transportador carnitina/acilcarnitina (40). Desgraciadamente, no se dispone todavía de una estructura tridimensional de ningún MC en el estado m. Por otra parte, los cambios estructurales que ocurren durante la transición reversible entre los estados c y m son también desconocidos. El acontecimiento precoz en la translocación de sustrato a través de la proteína transportadora puede tener lugar un reconocimiento de sustrato no caracterizado.

Los estudios moleculares, indican que la tirosina es importante para el deslizamiento del ADP en el sitio de unión (41, 42), como ha sugerido Pebay-Peyroula et al. (18). Según la teoría del "ajuste de transición inducida" (43, 44), la unión del sustrato en la cavidad induce un reordenamiento del transportador en la región transmembrana para alcanzar un ajuste óptimo, entre la proteína y el sustrato, correspondiente al estado de transición. De hecho, el sitio de unión al sustrato en el transportador se compone de todos los residuos de la cavidad de transporte que interactúan con el sustrato cuando se alcanza el estado de transición.

Se propone un modelo, en el que en el estado de transición el transportador está casi cerrado en ambos lados de la membrana y el sustrato está enlazado en el centro del transportador. En concreto, el sustrato interacciona con los residuos de las hélices pares e impares transmembrana de los sitios de unión situados similarmente, así como con otros residuos que sobresalen dentro de la cavidad por encima y por debajo, dependiendo de su tamaño y forma. La energía total de unión de las interacciones proteína-sustrato en el estado de transición provoca cambios estructurales adicionales que son necesarios para completar el ciclo catalítico, incluyendo la apertura de la matriz o puerta citosólica (red de puentes salinos) y el cierre de la otra puerta en el lado opuesto de la membrana. La Figura 6 ilustra los cambios conformacionales (20) de las alfa hélices transmembrana de una única repetición (conocido como de los movimientos de las bisagras flexibles de la hélice) implicados en la transición entre los dos estados, basado en el conocimiento actual, así como la función de P y G de las alfa-hélices transmembrana discutida anteriormente.

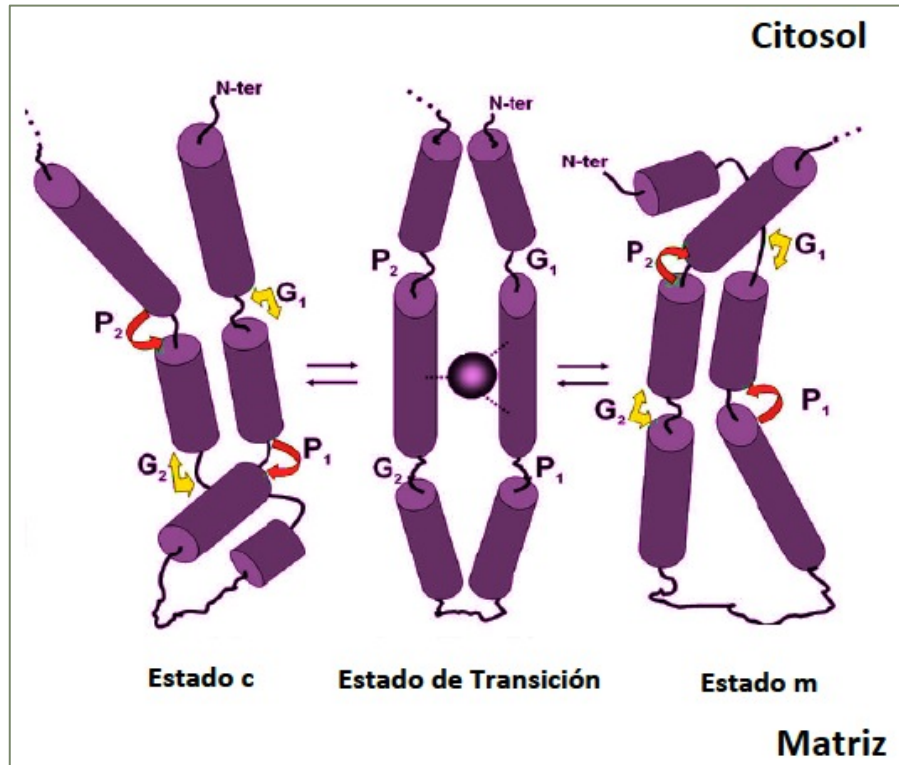


Figura 6.- Representación esquemática de los cambios conformacionales de las seis α -hélices transmembrana de los MCs durante el ciclo de transporte catalítico

Cambios estructurales de las alfa-hélices transmembrana de una única repetición (incluyendo los segmentos externos a los residuos P y G, que son aquellos que sufren los principales cambios). Por motivos de claridad, los subíndices 1 y 2 se añaden a la P y a la G para identificar más fácilmente la hélice transmembrana impar y par. El lado izquierdo corresponde al estado c, el lado derecho al estado m y la parte media al estado de transición, el óvalo gris en el estado de transición indica el sustrato de éste; las flechas amarillas indican la capacidad de G para doblar las hélices, y las flechas rojas indican vuelta/giro en P. El ángulo de observación es el mismo que el del panel B. El eje matriz de soporte está más cerca del lector. (Modificado de F.Palmieri, C.L.Pierri: FEBS Letters: 584, (2010) 1931-1939).

Como resultado de estos cambios estructurales, en la transición del estado c al m, la puerta en la cara de la matriz cede y las hélices pares-impares se separan al mismo tiempo que se reúnen para cerrar la puerta en la cara citosólica. Lo contrario ocurre durante la transición del estado m al estado c. El modelo descrito anteriormente se refiere al mecanismo de intercambio de sustrato catalizado por MCs. En el intercambio 1:1, la barrera de energía de activación para la reorientación del sitio de unión del sustrato en el transportador es superada sólo cuando el sustrato está unido a la proteína.

Para algunos transportadores, que catalizan uniporte (aunque a una tasa más baja), además de intercambio, la barrera de energía de activación necesaria para los cambios conformacionales que conducen a la transición entre los dos estados es mucho menor que la de los transportadores de intercambios obligatorios (40, 43), por lo que los transportadores de uniporte puede reorientarse en ausencia de sustrato. Según Robinson et al. (25), el modo de transporte con uniporte está relacionado con la debilidad de una o ambas redes de puentes salinos. Una consideración adicional es que el modelo descrito anteriormente implica que cada monómero del MC posee un canal o vía de translocación interna. Esto significa que los MCs funcionan como monómeros, como lo sugieren con fuerza los estudios de dominancia negativos realizados con el transportador ADP/ATP en la levadura (45).

Regulación de la actividad de los transportadores mitocondriales

Los MCs están generalmente presentes en cantidades mínimas y deben garantizar un caudal suficiente de flujo para satisfacer las necesidades de las respectivas vías metabólicas. Así, su actividad tiene que ser adaptada a diferentes tejidos en diferentes condiciones fisiológicas y metabólicas en diferentes estados energéticos.

La actividad del transportador puede ser regulada de diferentes maneras (60):

(i) Modulación de las fuerzas motrices, los parámetros cinéticos y concentraciones del sustrato transportado, contra-sustrato y sustratos competidores. La relevancia de los parámetros cinéticos de las isoformas de transportadores puede ser ejemplificado por la tasa de importación de fosfato en las mitocondrias (controlando la tasa de producción de ATP por la fosforilación oxidativa). Así, durante la contracción muscular, la capacidad del ubicuo transportador de Pi, PiC-B, que tiene una mayor afinidad por Pi, se sobrepasa y el

transportador de Pi, PiC-A específico de corazón y de músculo, con su afinidad por el sustrato inferior, se hace operativo con concentraciones aumentadas de Pi citosólico.

(ii) Interacción con activadores o inhibidores alostéricos. El transportador de ornitina, por ejemplo, se inhibe por espermina y espermidina y se estimulada por malato y fosfato; y los transportadores aspartato/glutamato, ATP-Mg/Pi son activados por Ca^{2+} . En este mecanismo de transducción de señal por Ca^{2+} , el Ca^{2+} ejerce efectos metabólicos reaccionando con los dominios N-terminales de estos transportadores sin entrar en los orgánulos.

(iii) Modulación de la expresión del gen del transportador a nivel de transcripción o traducción, como se muestra, por ejemplo, para el transportador del citrato (110).

ENFERMEDADES ASOCIADAS CON TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES

Las enfermedades relacionadas con los transportadores mitocondriales son errores del metabolismo raros, causados por alteraciones de los genes nucleares que codifican los transportadores mitocondriales. Los once trastornos conocidos se enumeran en la Tabla 3 del Anexo.

Las enfermedades relacionadas con transportadores mitocondriales se pueden dividir en dos grupos.

El primero, se refiere a los defectos de los transportadores mitocondriales directamente relacionados con la fosforilación oxidativa, como el transportador de ADP/ATP y el del PiC. La sintomatología de estas enfermedades se caracteriza por una producción insuficiente de energía en los tejidos donde se expresan estos transportadores y juegan un papel importante en la fosforilación oxidativa. Entre estas enfermedades también debe incluirse la adPEO (oftalmoplejía externa progresiva de herencia autosómica dominante), causada por mutaciones heterocigóticas del gen de la isoforma 1 del transportador ADP/ATP (así como otros genes nucleares), debido a que estas mutaciones provocan la inestabilidad del mtADN.

El segundo grupo de enfermedades, es debido a alteraciones de los genes que codifican transportadores mitocondriales que son necesarios para funciones mitocondriales (distintas de la fosforilación oxidativa) y otras funciones celulares.

Su sintomatología depende del metabolismo afectado y su importancia en tejidos específicos.

Con la excepción de la oftalmoplejía externa progresiva con herencia autosómica dominante, todas las otras enfermedades se heredan de forma autosómica recesiva.

ENFERMEDADES DEBIDAS A DEFECTOS MITOCONDRIALES DE LOS TRANSPORTADORES DIRECTAMENTE RELACIONADOS CON LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Dado que el sitio catalítico del complejo ATP sintasa está expuesto hacia la matriz mitocondrial, la introducción de fosfato inorgánico (P_i) y ADP en la mitocondria es esencial para la fosforilación oxidativa del ADP a ATP (ver Figura 1).

Esta introducción es catalizada por dos transportadores distintos, el P_iC y el transportador de ADP/ATP, respectivamente. También ha sido descrito el déficit de una isoforma de ambos transportadores.

Deficiencia de AAC1

En el año 2005, se describió una mutación en homocigosis en un paciente varón de 25 años de edad, de origen esloveno (46).

El gen SLC25A4 codifica el transportador ADP/ATP específico corazón/músculo (AAC1, también llamado ANT1). La mutación implica la sustitución de una alanina altamente conservada en posición 123 por un ácido aspártico (A123D). En la estructura cristalográfica de AAC1 de corazón bovino, A123 sobresale en la cavidad central, dos giros de hélice por encima de la red de puente salino y se localiza en el tercer segmento transmembrana dentro de la secuencia de consenso GXXXG, la cual se cree que participa en las asociaciones de alta afinidad entre alfa-hélices transmembrana (47). La sustitución A123D da como resultado una pérdida completa de la capacidad de la proteína para el

transporte de ADP y ATP en liposomas reconstituidos (46). Curiosamente, en contraste con otras mutaciones de AAC1 encontradas hasta ahora en humanos, A123D es la primera mutación recesiva encontrada en el gen AAC1.

La clínica del paciente afectado por la deficiencia de AAC1 (OMIM 192600) manifestaba intolerancia al ejercicio, con fácil fatigabilidad y dolor muscular y acidosis láctica (en condiciones de ayuno y en reposo), esta clínica apareció desde la primera infancia; durante la pubertad se diagnosticó una miocardiopatía hipertrófica (hipertrofia ventricular), lo que indica que la enfermedad es lentamente progresiva. No presentaba PEO (oftalmoplejía externa progresiva). En fibras de músculo esquelético del paciente, aparecían numerosas RRF (fibras rojas bizarras o rasgadas) y múltiples grandes deleciones en mtADN (sin reducción del número de copias normales de mtADN).

Las actividades de los tres complejos de la cadena respiratoria dependientes del mtADN (I, III y IV) fueron menores de lo normal y la actividad de la citrato sintasa fue mucho mayor de lo normal, probablemente debido a la proliferación mitocondrial compensatoria. Esta sintomatología se parece mucho a la de los ratones knock-out AAC1 (48). Al igual que en el modelo de ratón, la pérdida de la función AAC1 es compatible con la vida adulta, posiblemente debido a una compensación por las actividades de la glucólisis y/o transporte por otras isoformas del AAC u otros transportadores de nucleótidos de adenina mitocondriales, como el transportador ATP-Mg/Pi.

Deficiencia de PiC

En el año 2007, se encontró una mutación en homocigosis en el gen que codifica el PiC (SLC25A3) (c.215G → A) en dos hermanos con padres turcos no consanguíneos, heterocigotos para la misma mutación (50).

El gen humano, que se extiende sobre 8,3 kb de ADN, se asigna a 12q23.1 y contiene 9 exones codificantes, de los cuales, los exones 3A y 3B están estrechamente relacionados y unidos procesándose (corte y empalme) alternativamente (51). Las isoformas resultantes, denominadas PiC-A y PiC-B, difieren en 13 aminoácidos y parámetros cinéticos; pero tienen la misma especificidad de sustrato y sensibilidad a inhibidores (52). Ambas catalizan la captación de fosfato, ya sea por cotransporte con H^+ o intercambio de OH^- en la mitocondria a expensas del ΔpH componente de la fuerza protonmotriz generada por el transporte de electrones. Esta absorción de Pi en las mitocondrias es esencial para la fosforilación oxidativa del ADP a ATP.

Al igual que otras isoformas de las proteínas mitocondriales implicadas en la fosforilación oxidativa, el PiC-A se expresa abundantemente sólo en corazón y músculo, mientras que PiC-B se expresa en todos los tejidos (52) y (53).

Hay diferencias significativas en las propiedades cinéticas de las dos isoformas de PiC (la Km de PiC-B es 3 veces menor que la de PiC-A, y la Vmax de PiC-B es 3 veces mayor que la de PiC-A) y su abundancia en los tejidos (69 y 0 pmol de PiC-A por mg de proteína mitocondrial, y 10 y 8 pmol de PiC-B por mg de proteína mitocondrial en corazón e hígado bovino respectivamente), puede explicar la variación en la dependencia de tejidos en la fosforilación oxidativa.

La isoforma ubicua B de PiC se ajusta a las necesidades básicas de energía de todos los tejidos, y la isoforma PiC-A hace posible la mayor demanda de energía asociada con la contracción de las fibras musculares estriadas.

Curiosamente, la mutación c.215G → A encontrada en los dos pacientes, se localiza en el exón 3A y por lo tanto afecta a la isoforma PiC-A específica de corazón/músculo.

En la PiC-A de ambos pacientes la glicina 72, que se conserva en todas las secuencias PiC conocidas y en la mayoría de otros transportadores mitocondriales y que está localizada en la primera hélice transmembrana, a tres giros de hélice de la cara citosólica de la membrana; está sustituida por un residuo de ácido glutámico. Esta sustitución es deletérea para la función de la proteína (50).

La deficiencia de PiC (OMIM 610773) presenta una clínica característica de hipotonía muscular, miocardiopatía hipertrófica progresiva y acidosis láctica. En uno de los dos hermanos afectados, también se observó cianosis y poca ganancia de peso. Ambos pacientes fallecieron por fallo cardíaco a los 4 y los 9 meses.

Debido a la especificidad tisular, la sintomatología de la enfermedad, la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa era insuficiente sólo en el músculo. De hecho, se encontró que en las mitocondrias de corazón, la respiración de piruvato estimulada por ADP se reduce drásticamente, mientras que la respiración estimulada por desacoplante era normal (50). Las actividades de los enzimas de la cadena respiratoria, piruvato deshidrogenasa y ATPasa sensible a oligomicina, eran normales. No se detectaron mutaciones en los genes de las subunidades de la ATP sintasa codificadas por el mtADN o en SLC25A4 que codifica la isoforma específica corazón/músculo del transportador ADP/ATP.

En base a los resultados indicados anteriormente, podemos considerar que la enfermedad es debida a un defecto de importación de Pi a las mitocondrias mediada por PiC-A, lo que impide la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa.

Oftalmoplejía Externa Progresiva autosómica dominante (adPEO)

La adPEO es una enfermedad clínica y genéticamente heterogénea, que generalmente se hereda como un rasgo dominante. Está causada por defectos en ciertos genes nucleares y se caracteriza por delecciones múltiples en el mtADN en tejidos post-mitóticos (54-56).

La adPEO constituye un ejemplo de defectos genéticos nucleares que producen delecciones en el mtADN, afectando a la producción de proteínas de la cadena respiratoria lo que conduce a un defecto en la producción de energía.

Se manifiesta con un fenotipo de aparición generalmente en el adulto (hacia los 20-40 años de edad), aunque también se ha descrito de aparición precoz.

Los síntomas típicos de la enfermedad son PEO (oftalmoplejia externa progresiva) debido a la debilidad de los músculos motores oculares externos, ptosis, y una miopatía descendente leve. Pueden aparecer otros síntomas variables como catarata bilateral, hipoacusia neurosensorial, temblor, ataxia, neuropatía periférica de sensibilidad y motora, debilidad muscular generalizada, intolerancia al ejercicio, depresión, parkinsonismo y trastornos endocrinos.

Los niveles séricos de lactato son normales o ligeramente aumentados. Las biopsias musculares de los individuos afectados presentan fibras rojas rasgadas (RRF), fibras citocromo c oxidasa negativas, y disminución de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria.

El análisis por Southern de ADN de músculo revela la presencia de especies de mtADN heterogéneas debido a múltiples delecciones a gran escala que van desde 3,0 a 8,5 kb de longitud. Las lesiones del mtADN mitocondrial están presentes y se acumulan en los tejidos post-mitóticos, principalmente cerebro, músculos y corazón. Esto está de acuerdo con la distribución tisular de AAC1 en el hombre, en la que la isoforma AAC1 del transportador de ADP/ATP es la predominante en el músculo esquelético y corazón, y también está presente en el cerebro.

La PEO, es una de las enfermedades más frecuentes causadas por deleciones primarias en el mtADN. Sin embargo, recientemente se han visto, a través de análisis de ligamiento, mutaciones de tres genes nucleares responsables de adPEO que producen deleciones secundarias múltiples de mtADN. Uno de estos genes nucleares es SLC25A4 está localizado en el sitio 4q34 y codifica el AAC1 mitocondrial específico de corazón/músculo (OMIM 609283). Los otros dos genes implicados en la adPEO, no relacionados con el SLC25A4 son Twinkle, en el sitio 10q24, que codifica una helicasa del mtADN (OMIM 606075), y POLG1 en el sitio 15q25 que codifica la subunidad catalítica de la polimerasa γ específica del mtADN (OMIM 157640). Estas mutaciones en los genes POLG1 y Twinkle son la causa más frecuente de la PEO, mientras que las mutaciones en el gen SLC25A4 son más raras.

Además, al menos un cuarto locus debe estar implicado en base a los casos que no pueden ser producidos por cualquiera de los tres genes citados anteriormente. La PEO dependiente de mutaciones nucleares se suele heredar como un trastorno autosómico dominante, pero han sido descritos casos con herencia autosómica recesiva en familias portadoras de mutaciones heterocigóticas en el gen POLG1.

Se conocen cuatro mutaciones en heterocigosis en AAC1 (A90D, A114P, L98P, D104G) en familias con adPEO y una (V289M) en un caso esporádico.

En la estructura cristalográfica de AAC1 bovino, estas mutaciones conectan con la membrana a excepción de D104G que se encuentra en el bucle citosólico entre H2 y H3. Todas las mutaciones están cerca de la cara citosólica de la proteína transportadora, a tres a cuatro giros de hélice del sitio de unión común. La adPEO relacionada con AAC1 es relativamente benigna, debido a que los síntomas se limitan generalmente a los músculos esqueléticos y faciales.

Como es habitual en las enfermedades causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial, el tratamiento de la adPEO es sintomático e incluye seguimiento oftalmológico y cirugía de la ptosis.

Los genes Twinkle y POLG1 están directamente involucrados en la reparación y la replicación del ADN mitocondrial, mientras que AAC1 cataliza el intercambio de ADP citosólico por ATP intramitocondrial. Por lo tanto, el mecanismo por el cual las mutaciones en AAC1 causan inestabilidad en el mtADN no está claro.

Se han propuesto varias hipótesis; las mutaciones pueden:

(i) modificar las propiedades del transporte de AAC1;

(ii) alterar el pool intramitocondrial de nucleótidos de adenina causando una escasez de ADP, que puede hacerle insuficiente para la síntesis de dATP mediante la acción de la ribonucleótido reductasa y la nucleósido difosfoquinasa y, en consecuencia, producir una alta tasa de error de la polimerasa del ADN mitocondrial, produciendo una importación defectuosa de las proteínas mitocondriales mutadas, lo que lleva a proteínas mal plegadas más susceptibles a las ROS y/o un aumento de la producción de ROS en la mitocondria con el consiguiente daño del ADN mitocondrial.

Para investigar las consecuencias funcionales de las mutaciones en AAC1 humano, encontradas en pacientes con adPEO, se introdujeron las mutaciones en posiciones equivalentes en AAC2, el ortólogo de la levadura del AAC1 humano (57). La característica dominante de la alteración del ADN mitocondrial inducida por alelos patógenos *aac2* es similar en la levadura y en pacientes con adPEO.

ENFERMEDADES DEBIDAS A DEFECTOS MITOCONDRIALES DE TRANSPORTADORES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO INTERMEDIARIO

Las enfermedades de este grupo, conocidas hasta ahora son la deficiencia de la CAC, el síndrome de HHH, la deficiencia de AGC2 y AGC1, la microcefalia de los Amish, la epilepsia mioclónica neonatal,.

Deficiencia de CAC

Deficiencia del transportador carnitina-acilcarnitina (CAC) -también conocida como deficiencia de la carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT)- (OMIM 212138) es el primer trastorno que se ha asociado con un miembro de la familia de genes SLC25, el SLC25A20 (58, 59).

Este gen, que se extiende aproximadamente 42 kb, contiene 9 exones, mapea en 3p21.31 y codifica el CAC, una proteína de 301 aminoácidos (58, 60). La función del CAC se conserva en todos los eucariotas, aunque en los mamíferos el CAC tiene una mayor afinidad por los grupos acilo de cadena larga y menor afinidad por carnitina libre, en

contraste con los transportadores de levaduras (61). El CAC es el componente clave del ciclo de la carnitina. Al catalizar el intercambio carnitina/acilcarnitina, el CAC introduce restos acilo grasos a la mitocondria, donde se oxidan por la beta-oxidación. Esta vía es la fuente principal de energía para el corazón y músculo esquelético durante el ayuno y el ejercicio físico. Además del intercambio, el CAC también es capaz de realizar el transporte unidireccional de los sustratos a través de la membrana mitocondrial interna, pero a un ritmo mucho menor (alrededor de una décima parte del ritmo de intercambio). El uniporte de carnitina en mitocondrias deplecionadas de carnitina es importante desde un punto de vista fisiológico para equilibrar el nivel de la carnitina en la matriz, con el existente en el citosol, requisito previo para una óptima actividad carnitina/acilcarnitina. Teniendo en cuenta que el transporte mediado por CAC es un paso esencial en la vía de la beta-oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, la deficiencia de CAC supone un trastorno de esta oxidación afectando a la obtención de energía a partir de ácidos grasos de cadena larga.

La deficiencia de CAC fue descrita por primera vez en 1992 por Stanley et al. (62). Se trata de un trastorno recesivo autosómico grave, con igual presentación en ambos sexos. Los órganos más afectados son corazón, hígado, cerebro y músculo esquelético.

El trastorno, se manifiesta con episodios potencialmente fatales de coma en estado de ayuno (hay hipoglucemia, ya que el hígado es incapaz de producir cuerpos cetónicos a partir de los ácidos grasos durante el ayuno y los músculos consumen la glucosa), cardiomiopatía, arritmia cardíaca, debilidad muscular y función hepática alterada (probablemente por acumulación de ácidos grasos de cadena larga y acilcarnitinas que no pueden ser oxidados). Otros síntomas que pueden aparecer son: vómitos, letargo, hipotonía, debilidad, hepatomegalia, insuficiencia cardíaca, dificultad respiratoria y convulsiones. Junto a la hipoglucemia, aparecen otras alteraciones metabólicas en la sangre como hipocetosis (causada por la falta de beta-oxidación de ácidos grasos hepática), acidosis, hiperamonemia (posiblemente debido a un aumento compensatorio en la oxidación de aminoácidos), aciduria dicarboxílica, aumento de acilcarnitinas de cadena larga, disminución de carnitina libre, ligera elevación de los niveles de enzimas hepáticas y de creatina quinasa e hipocalcemia ocasional.

En cultivos celulares, se reducen notablemente o casi desaparecen las actividades del transportador CAC y de la beta-oxidación de los ácidos grasos, aunque los otros enzimas del ciclo de la carnitina como CPT I y CPT II, y los enzimas de la beta-oxidación muestran una actividad normal.

La deficiencia de CAC presenta dos fenotipos infantiles: el primero, y más común, tiene un inicio precoz en el período neonatal, y el segundo, más benigno, inicia en la infancia o con menor frecuencia, en edad prepuberal.

Los recién nacidos con la forma de inicio precoz se deterioran rápidamente poco después de su nacimiento; la tasa de mortalidad es alta, en general, mostrando una buena correlación de gravedad entre el fenotipo y el genotipo. Los lactantes cuyos transportadores CAC mantienen cierta actividad residual, no suelen presentar la afección cardíaca y pueden responder al tratamiento con triacilglicéridos de cadena media que no requieren de la carnitina para entrar en la mitocondria.

Cuando ambos fenotipos no son tratados, los pacientes con deficiencia del CAC sufren crisis hipoglucémicas, especialmente peligrosas en lactantes, ya que pueden conducir a daño cerebral, coma y muerte, o morir de parada cardíaca.

Actualmente, se conocen bastantes mutaciones en el gen SLC25A20 (58).

Algunas mutaciones con cambio de sentido (Figura 7) D32N, R133W, P230R y D231H; afectan a residuos de los motivos característicos presentes en todos los transportadores mitocondriales, y otras dos R178Q y G81R se refieren a los residuos cuyos equivalentes en el CAC de la levadura se considera que se unen al sustrato (24), lo que subraya la importancia de los motivos y de los sitios de unión a sustrato comunes (24) para la estructura y función de estas proteínas.

El diagnóstico precoz y el tratamiento son cruciales en pacientes con deficiencia de CAC. Las deficiencias de CAC pueden ser identificadas por los programas de cribado neonatal mediante espectrometría de masas, aunque en casos graves infantiles los resultados de las pruebas pueden estar disponibles cuando ya han aparecido síntomas en el niño. El tratamiento de mantenimiento y a largo plazo del paciente consiste en evitar el estado de ayuno con comidas frecuentes, una dieta rica en carbohidratos, baja en lípidos (de los cuales alrededor del 80% debe ser proporcionado como triacilglicéridos de cadena media), y complementada con ácidos grasos esenciales poliinsaturados .

Los pacientes deben tener un protocolo de emergencia accesible para asegurar la administración de glucosa por vía intravenosa en caso de fiebre, vómitos u otra enfermedad evitando la ingesta oral. El aporte de L-carnitina exógena puede ser útil, particularmente en individuos con niveles de carnitina muy deficitarios.

La deficiencia de CAC puede diferenciarse de otros trastornos del ciclo de la carnitina y beta-oxidación de ácidos grasos (por ejemplo, de deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, OMIM 201450) en cultivos de fibroblastos, por determinación de ácidos orgánicos en orina y perfiles de acilcarnitinas en plasma.

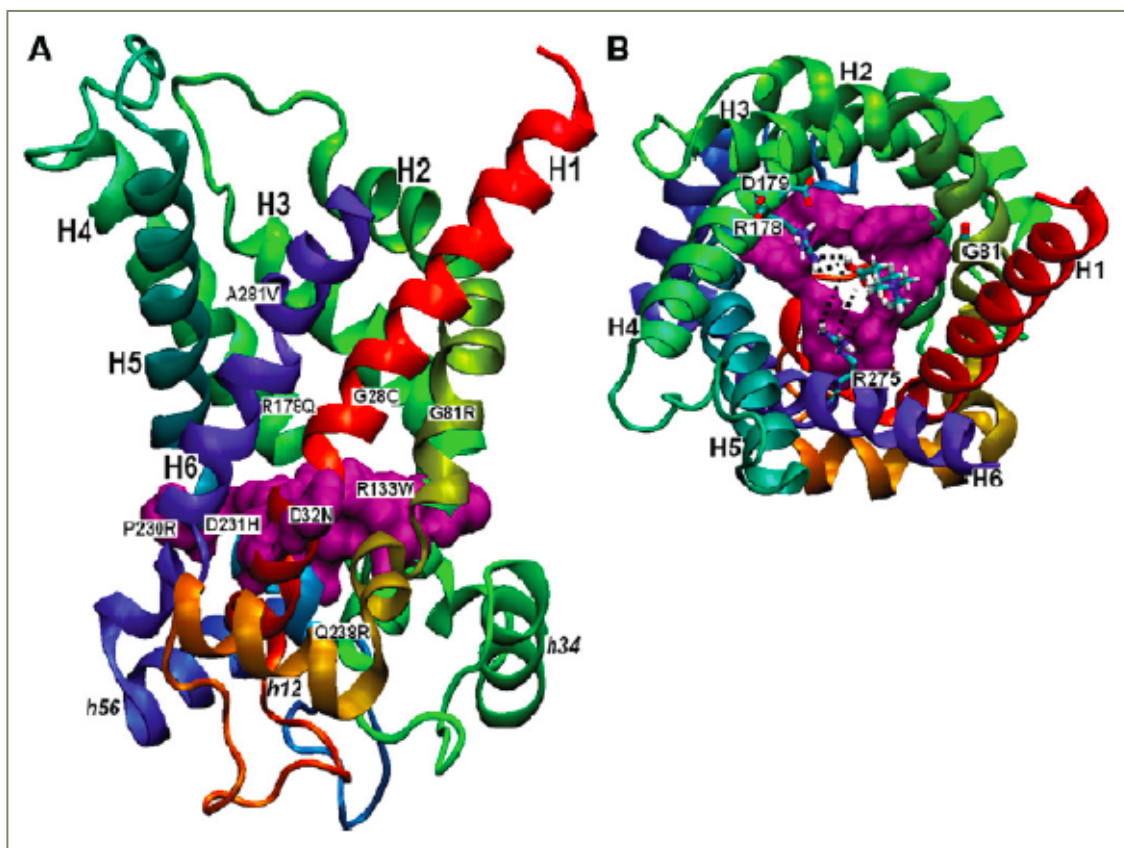


Figura 7.- Mutaciones en pacientes con deficiencia de CAC

(A) vista lateral del modelo de homología estructural de CAC humano (representado en las figuras) que muestra las posiciones de 9 sustituciones de aminoácidos en las deficiencias de la CAC.

(B) Vista del sitio propuesto de unión al sustrato desde el lado citoplásmico. El sustrato carnitina se muestra en la representación de barras. El código de color para las alfa-hélices transmembrana es: H1, rojo; H2, naranja-verde; H3, verde claro; H4, verde oscuro; H5, azul claro, y H6, azul. Las superficies de color púrpura resaltan la red de puente salino entre los residuos de K35 y D231, E132 y K234, y K135 y D32. (modificado de F.Palmieri, BBA: 1777,(2008), 564-578.).

El diagnóstico, debe ser confirmado *in vitro* por las determinaciones de la actividad de la beta-oxidación de ácidos grasos, la actividad del CAC (en cultivos de fibroblastos (63), en liposomas reconstituidos (64) o por complementación en *S. cerevisiae* (65) o *Aspergillus nidulans* (66)) y pruebas de ADN.

La determinación de la actividad transportadora es también importante para establecer si una mutación recién descubierta es causa de enfermedad.

Síndrome de HHH (Hiperornitemia-Hiperamonemia-Homocitrulinuria)

El síndrome de HHH (OMIM 238970), está causado por mutaciones en el gen SLC25A15 (67). Este gen, que se asigna a la banda 13q14.1, se extiende por unas 23 kb y contiene 6 exones codificantes de una isoforma del transportador de la ornitina, denominado ORC1.

El transportador de la ornitina se purificó de mitocondrias de hígado de rata en 1992; tiene importancia en el ciclo de la urea. Se ha clonado por primera vez en *S. cerevisiae* en 1997 (68). A partir de una levadura ortóloga, se han identificado dos isoformas humanas, el ORC1 y el ORC2, (67, 69). Las dos isoformas humanas se sobreexpresaron y caracterizaron en liposomas reconstituidos. Ambas transportan las isoformas-L de ornitina, lisina, arginina, citrulina por un intercambio de sustratos 1:1 o, en menor medida, por un intercambio de aminoácidos básicos por H⁺. Ambas son inactivadas por espermina y espermidina y estimuladas por malato y fosfato.

Estas isoformas difieren en algunos aspectos. El ORC2 tiene una especificidad más amplia que la ORC1, ya que transporta L y D-histidina, L-homoarginina e isoformas D de ornitina, lisina y arginina con la misma eficacia que las isoformas L. El ORC2 tiene mayor afinidad por lisina y arginina y menor afinidad por ornitina y citrulina que el ORC1. El ORC1 tiene mayor expresión que la ORC2 en todos los tejidos estudiados, y en particular en hígado, pulmón, páncreas y testículos (69).

El ORC, realiza una serie de funciones importantes en el metabolismo celular. En condiciones de bajo contenido de arginina en la dieta y/o en los tejidos donde la actividad argininasas es insignificante, la ornitina producida a partir del glutamato en el interior de la mitocondria tiene que ser exportada al citosol para llevar a cabo la biosíntesis de poliaminas. Por el contrario, cuando es alto el contenido de arginina en la dieta, la ornitina formada en el citosol por hidrólisis de arginina, tiene que ser importada al interior mitocondrial donde se convierte en glutamato y prolina por la ornitina aminotransferasa,

enzima localizado en la matriz mitocondrial y abundante en el hígado y en el riñón. La ornitina aminotransferasa hepática se localiza en hepatocitos pericentrales que contengan glutamina sintetasa y no en los hepatocitos periportales que contienen los enzimas del ciclo de la urea (70). En los hepatocitos periportales, el ORC realiza la importante función de intercambio de ornitina citosólica por citrulina mitocondrial. Al proporcionar esta función, el ORC enlaza las actividades enzimáticas de síntesis de la urea en el citosol a las de la mitocondria y por tanto es un componente esencial del ciclo de la urea, como ha sido propuesto (71 y sus referencias).

En condiciones fisiológicas, es muy probable que el paso crítico del ciclo de la urea que consiste en el intercambio ornitina/citrulina sea catalizado, principal o exclusivamente, por ORC1, ya que ORC2 tiene una menor afinidad por la ornitina y la citrulina y se expresa en el hígado a un nivel mucho más bajo, como se deduce de la deficiencia de ORC1 en pacientes con síndrome de HHH.

El síndrome de **HHH se caracteriza por hiperamonemia, hiperornitinemia y homocitrulinuria**. Estas alteraciones metabólicas, al igual que muchos de los síntomas clínicos de la enfermedad, son causadas por el defecto en el ORC1. La hiperamonemia es debida a la alteración del ciclo de la urea a nivel de ORC1, afectando la importación de ornitina desde el citosol a la mitocondria y, en consecuencia, impide la función intramitocondrial de la transcarbamoilasa de ornitina que condensa carbamoil fosfato y ornitina para formar citrulina. La acumulación de ornitina en el citosol explica la hiperornitinemia y conduce a un aumento de la producción de poliaminas. En ausencia de ornitina en el interior de las mitocondrias, el carbamoil-fosfato se acumula y se condensa, bien con lisina para formar homocitrulina, produciendo una homocitrulinuria, o entra en la vía biosintética de pirimidinas en el citosol, produciendo un aumento de la excreción de ácido orótico y uracilo. Otros hallazgos de laboratorio incluyen aumento de los niveles de los aminoácidos glutamina y alanina, y de los enzimas hepáticos transaminasas y fosfatasa alcalina.

El síndrome de HHH, puede aparecer a cualquier edad desde la fase neonatal hasta la edad adulta. Se suele manifestar en la primera infancia, un 10% de los pacientes lo presentan en el período neonatal.

Los síntomas más comunes de la enfermedad son: episodios de confusión, letargo y coma debido a la hiperamonemia y afectaciones neurológicas como retraso mental, dificultades de aprendizaje, paraplejía espástica y convulsiones. En la mayoría de los

pacientes que presentan disfunción piramidal, es frecuente que en la edad adulta sufran una paraplejía espástica franca, cuyo mecanismo patogénico es poco conocido (72). La afectación de la función hepática puede producir crisis tipo hepatitis, y trastornos de la coagulación con defectos específicos de factores (factores VII, IX y X). Algunos síntomas se presentan de forma aguda (episodios intermitentes de vómitos, ataxia, letargo, confusión, coma, convulsiones mioclónicas y afectación hepática), otros siguen un curso más crónico (aversión a alimentos ricos en proteínas, alteraciones de la coagulación, hipotonía, retraso del desarrollo, encefalopatía progresiva con regresión mental y/o disfunción piramidal).

De manera similar a otros defectos de ciclo de la urea, los recién nacidos pueden presentar síntomas poco tiempo después de la ingesta de alimentos. Tanto niños como adultos tienen tendencia a rechazar alimentos ricos en proteínas.

El fenotipo de los pacientes HHH aunque variable, es algo más benigno que los asociados con los defectos de los enzimas del ciclo de la urea. Puede ser que ORC2 compense parcialmente a ORC1. Se ha sugerido una ganancia de función del polimorfismo ORC2 y un haplogrupo (derivado de mtADN) (73) como posibles factores que puedan influir en el fenotipo de la deficiencia de ORC1.

Considerando que en el ratón la isoforma 2 de ORC es un pseudogen (dada la presencia de una delección de un solo nucleótido cerca del extremo 5'-causando un cambio de marco de lectura), sería interesante producir una delección en el ORC1 murino y comparar el fenotipo resultante con el de los pacientes HHH y el fenotipo de ratones knock-out de enzimas del ciclo de la urea.

El síndrome HHH, presenta una herencia autosómica recesiva con distribución pan-étnica con una mayor proporción de casos descritos en Canadá (mutación fundacional en Quebec), Italia y Japón. La relación de afectación hombre-mujer es de aproximadamente 2:1. Desde su primera descripción en 1969 por Shih et al. (74), cerca de un centenar de casos han sido descritos. En la figura 8, se indican mutaciones conocidas que aparecen naturalmente en el ORC1. Muchas de las mutaciones han sido analizadas funcionalmente en liposomas reconstituidos y se ha encontrado que inactivan al transportador (69, 75). Curiosamente, dos de las mutaciones que causan esta enfermedad, R275Q y E180K, se refieren a aminoácidos implicados en el sitio propuesto de unión a sustrato, mientras que las mutaciones T32R y P126R afectan a motivos característicos de la MCF (Figura 8). Además, 6 de las 14 mutaciones con cambio de sentido afectan residuos que sobresalen

hacia la cavidad ocupada por el sustrato entrante en la conformación citosólica del transportador (Figura 8).

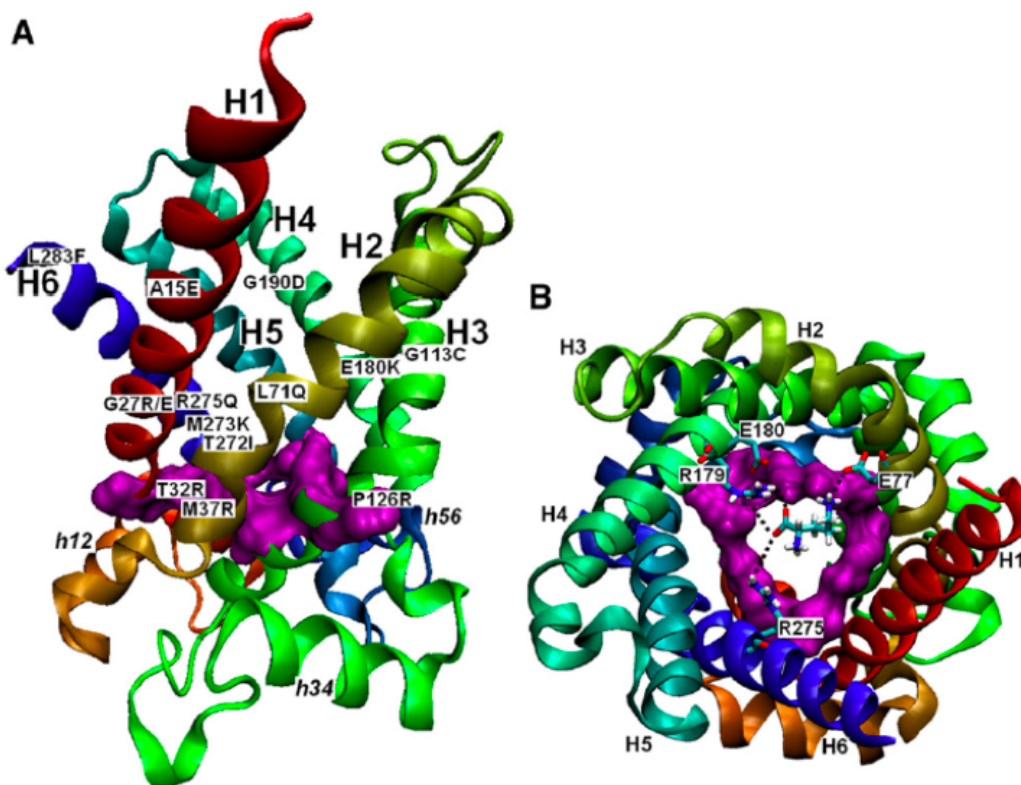


Figura 8.- Mutaciones en pacientes con síndrome de HHH

(A) vista lateral del modelo de homología estructural del ORC1 humano (representado en el dibujo) que muestra las posiciones de 14 sustituciones de aminoácidos encontradas en el síndrome de HHH. Las alfa-hélices transmembrana son de color como en la figura. 2. Las superficies de color púrpura resaltan la red del puente salino entre los residuos de K34 y D231, K234 y E128, y K131 y D31.

(B) Propuesta del sitio de unión a sustrato desde el lado citoplásmico. El sustrato ornitina se muestra en la representación de barras. (modificado de F.Palmieri, BBA: 1777,(2008), 564-578).

Es muy importante, para evitar el deterioro neurológico y cognitivo, el diagnóstico y tratamiento precoz del síndrome de HHH. Aunque a menudo se retrasa como consecuencia de síntomas inespecíficos.

El diagnóstico diferencial se basa principalmente en las alteraciones bioquímicas características: (i) persistencia de elevados niveles plasmáticos de ornitina (5 a 10 veces superiores a lo normal), lo que distingue el trastorno de otros defectos del ciclo de la urea, (ii) presencia de homocitrulina y ácido orótico en la orina, (iii) hiperamonemia episódica o postprandial, lo que diferencia la HHH con el síndrome de atrofia girada (OMIM 258870), causado por deficiencia de ornitina transaminasa, en el que no aparece hiperamonemia postprandial.

Tratamiento del síndrome de HHH

Como en otros defectos del ciclo de la urea, se basa principalmente en una dieta baja en proteínas. Por lo general, se acompaña de suplementos de citrulina y ornitina (para reducir la amonemia), aunque no se conocen los efectos secundarios a largo plazo de la hiperornitinemia. Se han administrado también arginina, benzoato de sodio y fenilbutirato de sodio para disminuir los niveles de amoníaco. Los pacientes tratados presentan un buen control metabólico y las recaídas de hiperamonemia son muy poco frecuentes. La tasa de mortalidad de la enfermedad es baja.

Deficiencia de AGC1 (transportador de aspartato/glutamato isoforma 1). Hipomielinización global cerebral

La deficiencia de AGC1 (OMIM 612949) ha sido descrita en una niña de tres años que presentó una hipotonía grave, detención del desarrollo psicomotor y convulsiones que comenzaron a los pocos meses de edad, seguido más tarde de espasticidad (76). Desde los 8 meses de edad en adelante, la RMN del cerebro reveló falta de mielinización en los hemisferios cerebrales, y la espectroscopia de protones por resonancia magnética de los lóbulos frontal y occipital mostró un pico reducido drásticamente de N-acetil aspartato. Las mismas características se observaron en los ratones knock-out para la AGC1 (77). La secuenciación del gen SLC25A12 del paciente reveló una transición homocigótica c.1769A → T en el exón 17, que produce una sustitución de glutamina por arginina en la posición 590 de AGC1 (76). Esta mutación altera un residuo altamente conservado en la subfamilia

del MC aspartato/glutamato, que sobresale en la cavidad interna del transportador justo por encima del sitio de unión del sustrato y que afecta la función de las proteínas.

De hecho, el recombinante mutante de AGC1, Q590R reconstituido en liposomas era completamente incapaz de catalizar el transporte de aspartato o glutamato, a diferencia del AGC1 de tipo salvaje. Se propuso, que la arginina en posición 590 atrapa el sustrato en el sitio de unión impidiendo su movimiento a través de la proteína y la interacción con los residuos cargados de la puerta de la matriz (76).

El AGC1 tiene dos funciones importantes: (i) la primera es suministrar aspartato al citosol mediante la catálisis de un intercambio entre aspartato intramitocondrial y glutamato citosólico (78), (ii) la segunda es participar en la transferencia de equivalentes reductores del NADH del citosol a la mitocondria siendo un componente clave de la lanzadera malato-aspartato (81). (Indivieri Kramer Palmieri JBC 87).

Teniendo en cuenta que AGC1 es la única isoforma de este transportador que se expresa en neuronas, la mayoría de los síntomas de la deficiencia de AGC1 se deben a la falta de función de AGC1 en las neuronas. En el cerebro de individuos sanos, el aspartato exportado desde las mitocondrias neuronales se utiliza principalmente para la producción de N-acetil aspartato que es el precursor de lípidos de la mielina; por lo que un defecto de la función de AGC1 en las neuronas causa una grave y extensa hipomielinización, el rasgo dominante de este síndrome. La clínica de la deficiencia de AGC1, por el contrario, sugiere que la lanzadera malato-aspartato no es tan esencial bioenergéticamente en neuronas como generalmente se piensa, probablemente porque la vía alternativa de la transferencia de equivalentes reductores en las mitocondrias, el ciclo de glicerol-3-fosfato, es suficientemente activo en las neuronas.

En la deficiencia de AGC1, se ha descartado la alteración de la fosforilación oxidativa al observarse que la acumulación de lactato era menor o no se presentaba y no aparecían en la resonancia magnética lesiones focales en los ganglios basales y núcleos del tronco cerebral.

La producción de ATP mitocondrial se redujo drásticamente tras la incubación de mitocondrias de músculo del paciente con glutamato más malato, pero no con cualquier otro sustrato respiratorio (76).

Deficiencia de AGC2 (transportador de aspartato/glutamato isoforma 2)

La deficiencia del transportador de aspartato/glutamato isoforma 2 (AGC2) es una enfermedad autosómica recesiva ampliamente distribuida en el Lejano Oriente y el sudeste asiático, con una prevalencia de portadores de aproximadamente 1 cada 70 personas y una relación hombre-mujer de 2,4:1 (79).

También, ha sido detectada en Oriente Medio, algunos casos en los EE.UU. y el Reino Unido, lo que apunta hacia una distribución pan-étnica.

Saheki encontró que el gen afectado en esta enfermedad era el gen SLC25A13, que tiene alrededor de 201 kb, se localiza en posición 7q21.3 y consta de 18 exones (80).

Posteriormente, se encontró que el producto del gen de SLC25A13, previamente denominado citrina, está estrechamente relacionado con su homólogo humano AGC1 (Aralar); ambos, AGC2 y AGC1 respectivamente, funcionan como transportadores aspartato/glutamato regulados por Ca^{2+} (78).

El AGC1 (codificado por SLC25A12 en el cromosoma 2q24) se expresa en cerebro, y músculo cardíaco y esquelético, mientras que AGC2 se encuentra en diferentes tejidos, pero más abundante en el hígado, donde AGC1 no se expresa (82) y (83). Estas proteínas de la membrana mitocondrial interna, unen Ca^{2+} , y consisten en dos dominios: el dominio C-terminal, que contiene todas las características de la secuencia de la familia de transportadores mitocondriales, y el dominio N-terminal, una extensión larga que contiene cuatro motivos de unión a Ca^{2+} y que sobresalen fuera de la membrana mitocondrial interna. En liposomas reconstituidos, AGC1 y AGC2 transportan aspartato y glutamato en un intercambio obligatorio 1:1. El intercambio es electroforético debido a que el aspartato se transporta como un anión, mientras que el glutamato se transporta con un protón (78).

En consecuencia, en mitocondrias energizadas con un potencial de membrana positivo en el exterior, la salida de aspartato y la entrada de glutamato están muy favorecidos y por lo tanto la reacción catalizada por AGC es esencialmente unidireccional e irreversible.

Los valores de K_m de las dos isoformas para aspartato y glutamato externos son aproximadamente 0,05 y 0,2 mM, respectivamente, no cambian con el potencial de membrana de los liposomas reconstituidos, y son prácticamente idénticos a los determinados con AGC nativo. Los dominios C-terminales de AGC1 y AGC2 cuentan con

las actividades y todas las propiedades de transporte de las dos proteínas enteras y constituyen su porción catalítica, mientras que los dominios N-terminales, que contienen los sitios de unión al Ca^{2+} , forman parte de su porción reguladora. De hecho, la actividad de AGC1 y AGC2 está estimulada por el Ca^{2+} en el lado externo de la membrana mitocondrial interna. Además, en la formación de ATP medida mediante luciferasa, se observó un excedente de producción de ATP en las mitocondrias de las células estimuladas agonísticamente que sobreexpresan AGC1 o AGC2 pero no en las células estimuladas por sobreexpresión de los dominios C-terminales que carecen de los sitios de unión al Ca^{2+} .

Es llamativo que el nivel de Ca^{2+} intramitocondrial sea el mismo en las células que sobreexpresan tanto la proteína entera (AGC1 o AGC2) o solo cada uno de los dos dominios C-terminales (84). Por lo tanto, el Ca^{2+} citosólico activa el metabolismo oxidativo mitocondrial a través de su unión al dominio N-terminal del AGC.

La **principal función del AGC es suministrar aspartato al citosol**. Esto es particularmente importante en los hepatocitos que tienen una capacidad insignificante de tomar aspartato de la sangre. En los hepatocitos, AGC tiene un papel fundamental en la síntesis de la urea por suministrar aspartato al **argininosuccinato sintetasa (ASS)**, un enzima del ciclo de la urea que se localiza en el citosol y condensa citrulina y aspartato para producir ácido argininosuccínico.

Además de la síntesis de la urea, el aspartato citosólico es necesario para la gluconeogénesis y para la síntesis de proteínas, purinas y pirimidinas. El aspartato citosólico es también muy importante para la oxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$ citosólico, ya que el AGC es un componente clave de la lanzadera malato-aspartato que transfiere los equivalentes reductores del $\text{NADH} + \text{H}^+$ desde el citosol a la mitocondria. En esta lanzadera, el AGC proporciona de nuevo aspartato al citosol; en el citosol el aspartato se convierte por transaminación en oxalacetato mediante la aspartato amino transferasa citosólica, la cual se reduce por la malato deshidrogenasa citosólica a malato, dando lugar a la oxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$ citosólico. El malato entra en la mitocondria a través del transportador del oxoglutarato y en la matriz se oxida a oxaloacetato por la malato deshidrogenasa mitocondrial, reduciendo NAD^+ intramitocondrial. Posteriormente, el oxaloacetato es transaminado a aspartato por la aspartato aminotransferasa mitocondrial, completando el ciclo.

Debe destacarse, que la lanzadera malato-aspartato actúa en la dirección de la transferencia de equivalentes reductores desde el citosol a las mitocondrias, porque la

reacción catalizada por AGC es unidireccional e irreversible. Por oxidación de NADH citosólico, el ciclo de malato-aspartato permite que se produzca la glicólisis aeróbica y el metabolismo del alcohol.

También, es importante señalar que la lanzadera del glicerol-3-fosfato, que es el principal mecanismo fisiológico alternativo para la oxidación de NADH citosólico, presenta una baja actividad en el hígado humano (aunque es muy activa en el hígado murino).

Debido a que AGC2 es la única isoforma, o al menos la isoforma expresada más frecuente de este transportador en el hígado, la falta de su función en este tejido explica muchos síntomas de la enfermedad.

La deficiencia de AGC2, causa dos fenotipos dependientes de la edad de aparición: **colestasis intrahepática neonatal causada por deficiencia de citrina (AGC2) (NICCD, OMIM 605814)** y una **citrulinemia tipo II** en la edad adulta (**CTLN2, OMIM 603471**). La citrulinemia tipo II se manifiesta generalmente en los adultos entre las edades de 20 y 50 años. La escasez de aspartato en el citosol de los hepatocitos causa citrulinemia, hipoproteïnemia, y episodios recurrentes de hiperamonemia causante de la encefalopatía observada y de los síntomas neuropsiquiátricos (como trastornos de comportamiento repentinos, alteración de la conciencia, delirio, desorientación, temblor, convulsiones y coma).

La inhibición de la oxidación del NADH citosólico, con el consiguiente aumento en la relación NADH/NAD^+ , provoca un rechazo de los hidratos de carbono y una preferencia por las grasas y especialmente por proteínas, así como una incapacidad de consumir alcohol. Se ha descrito una atracción por tomar alubias y frutos secos, que son particularmente ricos en aspartato y asparagina. La citrulinemia y la hiperamonemia son también debidas a una característica única de la enfermedad, una reducción variable específica de la proteína ASS del hígado y de su actividad, sin alteraciones en el gen ni en niveles de mRNA de la ASS hepática (85).

Por el contrario, en la **citrulinemia tipo I (CTLN1, OMIM 215700)** el gen de la ASS se encuentra mutado, lo que lleva a la deficiencia de ASS en todos los tejidos (86). Todavía no está claro por qué el nivel de ASS hepática es bajo en CTLN2. Puede ser que se requieran niveles críticos de aspartato para hacer activo a ASS o para estabilizar el enzima. Los pacientes también presentan hígado graso probablemente porque oxidan el $\text{NADH} + \text{H}^+$ citosólico por otra vía, la síntesis de ácidos grasos mediante la transferencia de acetil-coenzima A de la matriz mitocondrial al citosol. De hecho, el enzima clave de la lanzadera

citrato-malato, el transportador del citrato, exporta citrato de las mitocondrias al citosol, donde se escinde en acetil-coenzima A y oxalacetato por la ATP-citrato liasa. Además, algunos pacientes desarrollan hiperlipidemia probablemente como resultado del funcionamiento de la lanzadera citrato-malato y de la acumulación de glicerol-3-fosfato debido a una pobre actividad del ciclo del glicerol-3-fosfato en el hígado humano.

También aparece un incremento de los niveles de arginina y de los niveles del inhibidor de tripsina pancreática, un aumento de la proporción treonina-serina, y una disminución en la proporción entre aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) respecto a aminoácidos aromáticos (AAAs) en el suero del paciente. Por último, se produce pancreatitis y carcinoma hepatocelular con mayor incidencia en pacientes con CTLN2.

La citrulinemia tipo II de aparición en el adulto es progresiva y los pacientes generalmente mueren por causa de la encefalopatía hiperamonémica y complicaciones del edema cerebral. Dado el mal pronóstico del fenotipo en la deficiencia AGC2 en la población adulta, los pacientes deberían considerar someterse a un trasplante de hígado. En el fenotipo neonatal de NICCD, descrito por Saheki y colaboradores (87); los niños afectados suelen presentar colestasis intrahepática transitoria, hígado graso, hepatomegalia, retraso del crecimiento, citrulinemia, aminoacidemias (elevación de metionina, treonina, tirosina, fenilalanina, lisina y arginina), un aumento del cociente treonina/serina y de la concentración de galactosa, además de hipoglucemia cetósica, y hipoproteinemia. Algunos pacientes presentan hepatitis, ictericia, disminución de factores de coagulación, anemia hemolítica y diátesis hemorrágica, como resultado de la disfunción del hígado y la hipoproteinemia.

En la NICCD hay niveles altos de alfa-fetoproteína en plasma, pero no en CTLN2.

El fenotipo neonatal de la deficiencia de AGC2 es generalmente benigno. Los síntomas desaparecen hacia los 12 meses de edad, después, estos pacientes se convierten en aparentemente sanos (o manifiestan síntomas no específicos), pero muestran una preferencia por alimentos ricos en proteínas y ricos en lípidos y una aversión por los alimentos con alto contenido de hidratos de carbono. Una o varias décadas más tarde, algunas personas con deficiencia de AGC2 desarrollan CTLN2.

El espectro clínico de la deficiencia de AGC2 se ha ampliado recientemente con la descripción de una presentación infantil caracterizada por retraso en el desarrollo y diátesis hemorrágica sin evidencia de colestasis intrahepática neonatal (88).

En el período compensatorio de transición de NICCD a la aparición de CTLN2, los individuos afectados viven con trastornos metabólicos que implican principalmente el hígado, es decir, una alta relación NADH/NAD⁺ citosólicos y alteraciones en la síntesis de la urea. Es probable que en el hígado deficiente en AGC2, la oxidación parcial de NADH citosólico se logre por la baja actividad de la lanzadera glicerol-3-fosfato/NADH y por el ciclo de citrato-malato, como se mencionó anteriormente. Dado que en el hígado del paciente la exportación de aspartato desde la mitocondria es casi nula y virtualmente no se toma aspartato por la sangre, la ureagenesis es dependiente de la producción de aspartato en el citosol.

El aspartato puede ser producido en el citosol de dos maneras: a partir de la asparagina por la acción de la asparaginasa y de oxalacetato por la aspartato aminotransferasa citosólica. La asparagina puede ser sintetizada por asparagina sintetasa o puede ser suministrada a partir de la dieta a través de la sangre venosa portal. El oxalacetato puede formarse a partir de fumarato, un producto del enzima del ciclo de la urea argininosuccinato liasa, por las acciones sucesivas de la fumarasa y la malato deshidrogenasa citosólicas.

En ambos casos, surgen graves inconvenientes, es decir, la producción de 1 mol de amoníaco por cada mol de aspartato proporcionado por la asparagina y la generación de 1 mol de NADH + H⁺ por cada mol de aspartato proporcionado por el oxaloacetato procedente de malato.

Por lo tanto, en el paciente con deficiencia de AGC2, el déficit de ureagenesis se debe no sólo a una menor disponibilidad de aspartato para la ASS (argininosuccinato sintasa), sino también a un aumento del NADH / NAD⁺ citosólico como consecuencia de la lanzadera malato-aspartato NADH defectuosa y de la producción de aspartato de fumarato, como ya hemos mencionado.

SLC25A13 es el único gen conocido asociado con deficiencia de AGC2. Las primeras mutaciones observadas en SLC25A13 producen tanto un truncamiento de la proteína o extensas deleciones que causan la deficiencia de AGC2 (89). Más recientemente, también se han encontrado mutaciones con cambio de sentido. No se ha observado ninguna correlación significativa entre tipos de mutación de SLC25A13 y la edad de inicio de la CTLN2. Hasta ahora se han encontrado poco más de cuarenta mutaciones en pacientes con deficiencia de AGC2. La mutación R588Q que inhibe, en torno a un 90%, el transporte de glutamato y aspartato en liposomas reconstituidos (90) se refiere a un residuo que

pertenece al sitio común propuesto de unión a sustrato, formado por R588, R492, E404 y K405 residuos equivalentes a los propuestos se unen al sustrato en AGC1 de levaduras (R792, R692, E600 y K601) (24). R588 también se corresponde con R275 del ORC1 humano, y su sustitución por Q provoca el síndrome de HHH, como ya hemos citado.

Para estudiar las consecuencias de la mutación R588Q, se realizó un acoplamiento de glutamato utilizando los residuos del sitio común de unión sustrato de AGC2 humano (91). El acoplamiento de glutamato con AGC2 humano de tipo salvaje muestra el sustrato directamente en la parte superior de la red de puente salino interaccionando con R588 y los residuos cargados K453 y K353 de la red (Figura 9 A). En el caso del mutante R588Q, el sustrato está colocado lejos de la red de puente salino a nivel del sitio de unión (Figura 9 B). Por lo tanto, la falta de R en la posición 588 impide la interacción del sustrato con los puentes de sal que causando una pérdida de actividad. Es tentador especular que el residuo R588 funciona como una cadena lateral móvil que transporta el sustrato sobre los puentes de sal, determinando su apertura y la progresión del sustrato a través de la proteína hacia la matriz.

La fisiopatología del déficit de AGC2 ha sido estudiada en ratones knock-out (92). Los ratones SLC21A13^{-/-} mostraron una marcada disminución en el transporte mitocondrial de aspartato y de actividad de la lanzadera malato-aspartato in vitro. En el hígado perfundido con amoníaco, la tasa de producción de urea se reduce drásticamente con un incremento de la relación de lactato a piruvato, que refleja el estado redox de NADH/NAD⁺ citosólicos. Bajo estas condiciones, tanto el déficit en ureagénesis como el aumento de la relación NADH/NAD⁺ se corrigieron parcialmente por la administración de asparagina que entra en los hepatocitos y se hidroliza a aspartato.

Del mismo modo, el piruvato (pero no el aspartato o el citrato) reduce el déficit en la ureagenesis y disminuye la relación NADH/NAD⁺ en el sistema de hígado perfundido. Además, en el hígado perfundido con lactato (pero no piruvato) disminuye la gluconeogénesis. Estos resultados demuestran que el aspartato citosólico hepático es limitante de la velocidad en ratones SLC25A13^{-/-}.

Sin embargo, los ratones knock-out de AGC2 no manifiestan los síntomas principales de la deficiencia de AGC2 presentes en el hombre. Los ratones no presentaban hiperamonemia ni cambios en los niveles de aminoácidos, incluso tras la administración de dietas ricas en proteínas, ni hipoglucemia en ayuno. La explicación más probable de la falta

de fenotipo similar a CTLN2 en los ratones knock-out de AGC2 es la alta actividad del ciclo de glicerol-3-fosfato en el hígado.

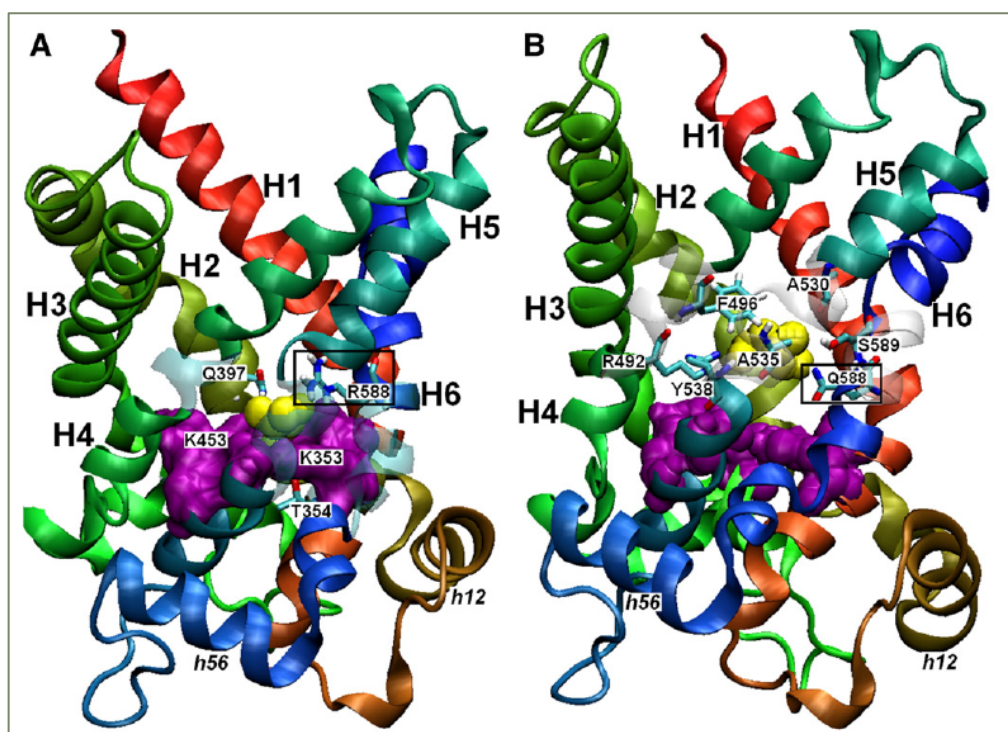


Figura 9.- Modelo de homología estructural de AGC2 humano que ilustran el papel de R588 en la translocación del sustrato a través del transportador. Acoplamiento de glutamato en la R588 de AGC2 de tipo salvaje (A) y el AGC2 mutado en Q588 (B) visto desde el lado lateral

A) y el AGC2 mutado en Q588. **(B)** visto desde el lado lateral. El glutamato se muestra en la representación de van der Waals y coloreado en amarillo. Las representaciones con barras resaltan algunos residuos que se encuentran dentro de 4 Å del sustrato. Las cajas rectangulares contienen los residuos R588 (A) y Q588 (B). Las porciones de hélices IV, V y VI (en A y B) y de la red de puente salino (en A) se ha transparentado para facilitar la observación del sustrato y las cadenas laterales de algunos aminoácidos. Las α -hélices transmembrana son de color como en la figura. 2. Las superficies de color púrpura resaltan la red de puente salino entre los residuos K353 y D542, E450 y K545, K453 y D350. (de F.Palmieri, BBA: 1777,(2008), 564-578).

En consecuencia, Saheki et al. generaron unos ratones con un trastorno combinado del gen AGC2 y del gen de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial, un componente clave del ciclo del glicerol fosfato (93).

Ratones knock-out dobles estudiados después de 40 días de edad manifestaban:

(i) una reducción en la tasa de crecimiento, lo cual es consistente con la observación de que por lo general los pacientes con CTLN2 son delgados y los pacientes con NICCD muestran retraso en el crecimiento;

(ii) hiperamonemia y aumento de la relación lactato a piruvato en condiciones de alimentación, que se incrementaron aún más después de la administración de sacarosa;

(iii) niveles elevados de citrulina en plasma y de la relación treonina/serina en condiciones de alimentación y de ayuno (no se ve alterada por la administración de sacarosa);

(iv) disminución de la relación de BCAAs/AAAs en plasma y del nivel de alanina tras la administración de sacarosa (ambos normales en condiciones de alimentación o de ayuno);

(v) hipoglucemia en ayunas debido al aumento de NADH/NAD⁺ citosólico que produce una disminución de la gluconeogénesis de sustratos reducidos y a la disminución del nivel de oxaloacetato por debajo del requerido por la fosfoenolpiruvato carboxicinasas;

(vi) hígado graso, niveles elevados de ácidos grasos libres y glicerol en plasma; este último debido a la pérdida de la actividad de la lanzadera del glicerol-3-fosfato en todos los tejidos y pérdida de la lanzadera malato-aspartato en el hígado; (vii) el contenido de aspartato hepático era menor en los ratones knock-out dobles respecto a ratones de tipo salvaje, y ratones knock-out de la lanzadera del glicerol-3-fosfato y AGC2 monogénicos (93).

Por lo tanto, los ratones knock-out dobles mostraban la mayoría de las características del fenotipo deficiente en AGC2 en humanos.

La deficiencia de AGC2, se debe sospechar en niños con hipoglucemia, hepatomegalia, retraso del crecimiento o retraso del desarrollo. Además, la deficiencia de AGC2 también debe ser considerada en niños con niveles elevados de galactosa en sangre.

Es importante confirmar el diagnóstico de la deficiencia de AGC2, ya que el tratamiento de estos pacientes es muy diferente al de los trastornos del ciclo de la urea.

Los pacientes con defectos enzimáticos del ciclo de la urea deben seguir una dieta con restricción de proteínas e hipercalórica para evitar episodios de hiperamonemia. Por el contrario, los pacientes afectados en CTLN2 manifiestan episodios graves de hiperamonemia en el consumo de dietas altas en carbohidratos. También, se han observado episodios graves de hiperamonemia después de la administración de glicerol o fructosa para el tratamiento de la hiperamonemia y edema cerebral (92).

El consumo de alcohol y el uso de medicamentos anti-inflamatorios y analgésicos y/o la cirugía pueden provocar a menudo síntomas de CTLN2.

Para evitar la hiperamonemia (y resolver el retraso del crecimiento en niños), es muy recomendable una dieta con un contenido alto de proteínas y lípidos y bajo en hidratos de carbono. Recomendación respaldada por la preferencia de los alimentos observada en estos pacientes. Se ha sugerido también el tratamiento con piruvato para disminuir la relación NADH/NAD⁺ en el citosol (94). En la actualidad, el trasplante de hígado es el tratamiento indicado para la citrulinemia tipo II.

Por otra parte, en los niños con NICCD, también se ha aplicado la suplementación con vitaminas liposolubles y el uso de una alimentación sin lactosa o una dieta de alto contenido proteico y bajo en carbohidratos (88).

En resumen, el tratamiento de NICCD requiere un control continuo de la dieta y vigilancia del crecimiento. El control continuo de estos pacientes es necesario para evitar una evolución grave en el futuro.

Microcefalia de los Amish (MCPHA)

La **microcefalia de los Amish (MCPHA, OMIM 607196)**, es un error innato del metabolismo, con una microcefalia grave y aciduria 2-oxoglutarica (cetoglutarica) (95).

Este trastorno, está causado por un defecto en el gen SLC25A19 que codifica una proteína de 320 residuos (96). Esta proteína fue identificada primero como un transportador de desoxinucleótido (DNC) (97) y más tarde como un **transportador de pirofosfato de tiamina (TPC)** (98). En liposomas reconstituidos, el TPC transporta el importante coenzima pirofosfato de tiamina (ThPP), monofosfato de tiamina (ThMP) y

desoxinucleótidos **dNDP> dNTP> dNMP**, mediante un mecanismo de intercambio obligatorio. Los nucleótidos también son transportados, aunque menos eficazmente que los desoxinucleótidos correspondientes. Además, los didesoxinucleósido trifosfatos que se producen en el citosol de didesoxinucleósidos, incluyendo fármacos antivirales análogos de nucleósidos y anticancerosos, son sustratos igualmente eficaces que dNDPs (97).

Hasta la fecha, la microcefalia Amish sólo se ha observado en miembros de la comunidad Amish en Pennsylvania, con una prevalencia alta (1/500). En esta comunidad, 23 familias afectadas con MCPHA descienden de una sola pareja ancestral que vivió en los años 1700.

La enfermedad, se caracteriza por microcefalia congénita grave, niveles altos de alfa-cetoglutarato en orina, muerte prematura (la máxima supervivencia observada es de 14 meses) y, como resultado de la microcefalia, convexidad del cráneo casi ausente y los rasgos faciales deformes. La única anomalía física no relacionada con el Sistema Nervioso es una micrognatia moderada. Los pacientes refieren que no se orientan por la vista o el sonido, presentan una acidosis metabólica incrementada por enfermedades virales episódicas, en algunos casos leve hepatomegalia, dificultad para mantener la temperatura normal del cuerpo y desarrollan un aumento de la irritabilidad.

En principio, se consideró que los mayores niveles de alfa-cetoglutarato podían ser el resultado de un defecto en el complejo alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, en uno de sus tres enzimas constituyentes: 2-oxo(ceto)glutarato deshidrogenasa (OMIM 203740), dihidrolipoamida succiniltransferasa (OMIM 126063) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (OMIM 246900).

Los genes que codifican estas enzimas fueron excluidos en base a ligamiento genético y análisis de haplotipos, lo que indica que este trastorno debe estar asociado con otros loci genéticos.

Mediante una exploración de todo el genoma, mapeo fino y análisis de haplotipos, se localizó el gen afectado en la MCPHA en una región de 2 Mb, en el cromosoma 17q25 (96) y (99). En esta región, se estudiaron los genes que codifican proteínas con funciones mitocondriales conocidas por la anormalidad presentada del oxoglutarato en la MCPHA, lo que sugiere una disfunción mitocondrial. En niños afectados fue identificado un cambio de nucleótidos homocigótico en la región de codificante de TPC, c.530G → C (NM_021734). Los padres de los afectados por la MCPHA son heterocigotos obligados.

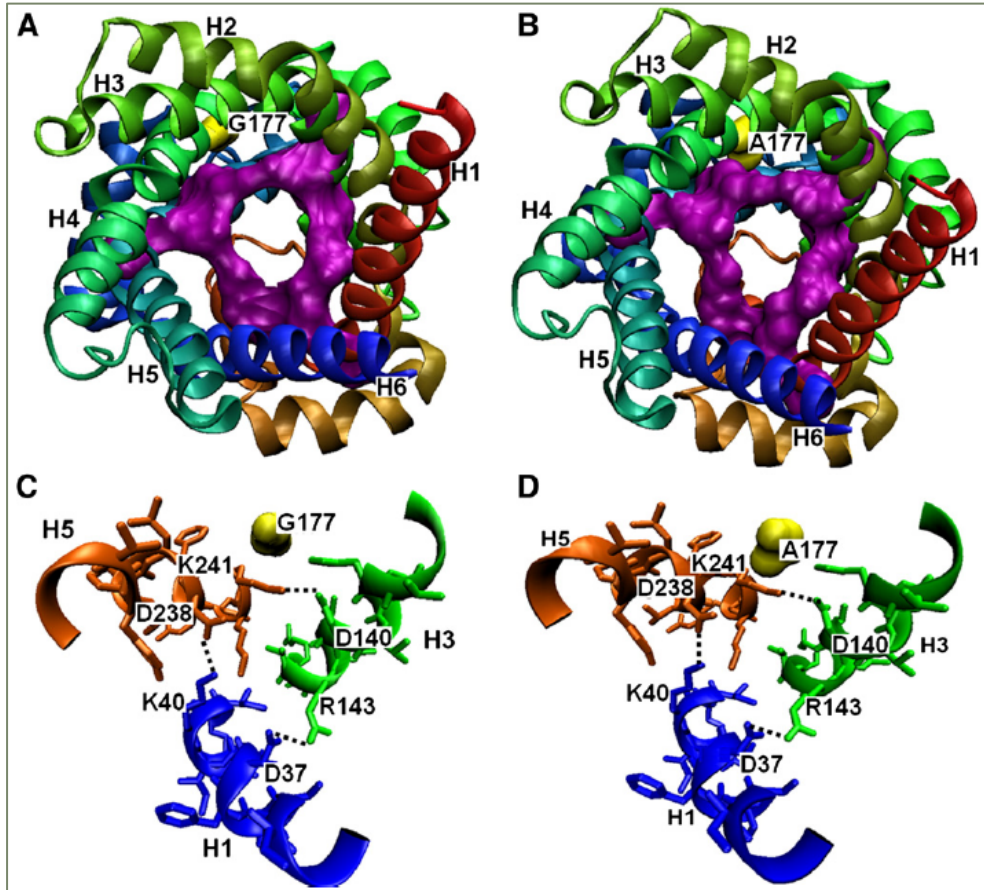


Figura 10.- Modelo de homología estructural del TPC humano mostrando la posición de G177A, la mutación responsable de la microcefalia de los Amish. Representaciones de la imagen de G177 de TPC de tipo salvaje (A) y la de A177 de TPC mutado (B) visto desde el lado citoplásmico

Los residuos G177 y A177 son en representación de color amarillo. Las alfa-hélices transmembrana son de color como en la figura 2. Las superficies de color morado resaltan la red de puente salino entre los residuos K241 y D140; R143 y D37; K40 y D238. Las representaciones en imágenes y barras que muestra la proximidad de G177 (C) y A177 (D) con el puente salino entre K241 y D140. G177 y A177 se representan de color amarillo. En C y D, los motivos característicos (P-X-D/E-X-X-K/R) de H1, H3 y H5 son de color azul, verde y naranja, respectivamente, con las cadenas laterales representadas con barras. Los puentes de sal están indicados por líneas de puntos negros. (de F.Palmieri, BBA: 1777,(2008), 564-578).

La mutación, que produce una sustitución de glicina por alanina en la posición 177, altera un residuo altamente conservado en la familia de los MCs. Esta alteración se encuentra en la segunda parte del motivo característico entre las hélices h₃₄ y H4, en la proximidad de uno de los importantes puentes de sal que cierran la vía de translocación del sustrato en la conformación citosólica del transportador (Figura 10).

La sustitución cosegrega con la enfermedad en las 16 familias estudiadas (96) y es deletéreo para la función de las proteínas. De hecho, en liposomas reconstituidos la actividad de transporte de ThPP, ThMP, o dATP mediada por el mutante de TPC G177A fue del 25-30% de la mediada por el TPC de tipo salvaje (98). Además, las sustituciones en G177 con restos de aminoácidos voluminosos como la valina, cisteína y leucina, no se toleran en absoluto (F. Palmieri, datos no publicados), como también se encontró en glicinas equivalentes en otros miembros de la familia de transportadores mitocondriales (33). Puede ser que G177 funcione como una bisagra entre las hélices h₃₄ y H4 durante los cambios conformacionales que ocurren en el ciclo catalítico del transportador.

SLC25A19, es el único gen conocido asociado con la microcefalia de los Amish. Para dilucidar el mecanismo patogénico de esta enfermedad, se ha generado un ratón knock-out para el gen SLC25A19, y se ha estudiado a nivel celular el fenotipo de ambos, los ratones knock-out y los pacientes (98).

Todos los ratones SLC25A19^{-/-} murieron antes de los 12,5 días de gestación. Los embriones homocigóticos a los 10,5 días (embrionarios) mostraron un desarrollo anormal del SNC con un defecto de cierre del tubo neural y exencefalia que normalmente involucra a todo el cerebro. Además, manifestaron insuficiencia eritropoyética, estando casi desprovistos de eritrocitos los embriones a los 9.5 días, y con niveles elevados de oxoglutarato en el líquido amniótico.

En las mitocondrias de fibroblastos de ratones knock-out y de linfoblastos de pacientes, no se observaron diferencias en los niveles de ribonucleósidos y desoxinucleósidos trifosfatos, ni se encontraron deplecciones o deleciones en el ADN mitocondrial, respecto a los controles.

Estos datos demuestran que, aunque SLC25A19 puede ser capaz de transportar dNDPs y dNTPs “in vivo”, esta función no es crítica, probablemente debido a una redundancia de los transportadores de desoxinucleótidos en las mitocondrias de mamíferos.

De acuerdo con la otra función del TPC (es decir, la importación de ThPP producido en el citosol a la mitocondria, intercambiándose con ThMP generado en el interior mitocondrial), se encontró que el ThPP y ThMP no eran detectables en las mitocondrias de fibroblastos de ratones knock-out y aparecían notablemente disminuidos en las mitocondrias de linfoblastos de pacientes en comparación con los controles. (ThPP y ThMP aumentaron en el citosol). En segundo lugar, en los medios de ambas líneas celulares se incrementó considerablemente el lactato, lo que indica una disfunción mitocondrial. Por último, las actividades de los complejos cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH) mitocondrial dependiente de ThPP y piruvato deshidrogenasa (PDH) estaban casi ausentes en extractos mitocondriales de ratones knock-out y muy disminuidas en extractos mitocondriales de pacientes. La adición de ThPP a los medios de ensayo del complejo KGDH y del PDH restauraba la actividad plenamente, mostrando que las actividades inferiores de KGDH y PDH en ratones knock-out y pacientes está causada por la falta de ThPP en la mitocondria (98). Todos estos datos en conjunto, sugieren que el transporte de ThPP es la función fisiológica primaria del TPC.

La Tabla 4, resume y compara los fenotipos de los ratones knock-out de SLC25A19 y los pacientes con microcefalia Amish.

Se puede observar, que todas las alteraciones metabólicas de la enfermedad humana, comenzando por la disminución del nivel de ThPP en las mitocondrias, estaban también presentes en los ratones knock-out. Sin embargo, estas anomalías, causadas por la falta de ThPP en la mitocondria, fueron más graves en los ratones knock-out. La única excepción se refiere al aumento de los niveles de oxoglutarato en el líquido amniótico, que resultaron ser menos graves que en la orina de los pacientes. Esto es debido al hecho de que los embriones de ratón murieron antes de la formación de los riñones y por lo tanto no concentraron el metabolito en la orina.

El aumento de la gravedad del modelo de ratón también se refleja en la letalidad embrionaria de los animales knock-out de SLC25A19, por la detención de la formación del cerebro a nivel del cierre del tubo neural, probablemente causado por la disminución de los flujos a través de KGDH y las reacciones de la PDH, y por insuficiencia eritropoyética tal vez causada por la falta de succinil-CoA, un producto de la KGDH. La explicación más probable para las diferencias entre los fenotipos de ratón knock-out y humanos es que la mutación puntual humana conserve alguna actividad de transporte de ThPP mientras que en la mutación murina sea nula.

Tabla 4.- Fenotipos de ratones knock-out y de los pacientes con microcefalia Amish

	Ratones knock-out	Pacientes
Actividad TPC	Ausente	Reducida a un 20-30%
Letalidad	Embrionaria	1-14 meses de edad
Defectos del SNC	Detención formación del cerebro (túbulo neural abierto)	Microcefalia
ThPP y ThMPmitocondriales^a	No detectables	Disminuidas
ThPP y ThMPcitosólicas^a	Muy elevadas	Elevadas
Actividades KGDH y PDH^a	Muy disminuidas	Disminuidas
KG^a	Aumentado ^b	Muy Aumentado
Lactato^a	Muy elevado	Elevado
Anormalidades en el mtDNA^a	Ausentes	Ausentes
Niveles de (d)NTP mitocondriales^a	Normales	Normales

En conclusión, la microcefalia Amish se debe a un defecto de transporte de ThPP en las mitocondrias, que afecta principalmente el desarrollo del cerebro debido a su gran necesidad del metabolismo oxidativo.

Preventivamente, se garantizan cribados metabólicos y eventuales estudios de imagen para todos los niños con microcefalia congénita. La no intervención o terapia con vitaminas se ha mostrado eficaz para tratar y/o mejorar el trastorno. En pacientes afectados de MCPHA sólo se dispone de terapia de apoyo. Se ha administrado fenobarbital para el tratamiento de las crisis, y se recomienda fisioterapia para aliviar las contracturas u otras manifestaciones neurológicas secundarias.

El riesgo genético de MCPHA se determina mejor en la fase pre-gestacional.

Epilepsia mioclónica neonatal- encefalopatía epiléptica precoz

Las mutaciones en el gen SLC25A22 que codifica la isoforma 1 del transportador de glutamato (GC1), causan una forma de **epilepsia mioclónica temprana (EME)**, llamada epilepsia mioclónica neonatal (OMIM 609304) (101). El gen SLC25A22 se mapea en el cromosoma 11p15.5 y contiene 8 exones codificantes. GC1 y su isoforma GC2, codificada por SLC25A18, se identificaron como transportadores de glutamato por sus propiedades de transporte en liposomas reconstituidos (102). Ambas isoformas se encuentran en la membrana mitocondrial (111) y catalizan un simporte glutamato/H⁺ de alta especificidad. GC1 tiene una K_m alta para el glutamato (~ 5 mM), mientras que el valor de la K_m de GC2 es baja (~ 0,22 mM). El valor de la V_{max} de GC1 es mayor que la de GC2 (102).

La isoforma 1 se expresa a niveles más altos que la isoforma 2 en todos los tejidos estudiados, particularmente en el hígado, el páncreas y el cerebro (102).

Las diferencias en los niveles de expresión y los parámetros cinéticos de las dos isoformas sugieren que la isoforma 2 cubre las necesidades básicas de todos los tejidos, especialmente con respecto a la degradación de aminoácidos, y que la isoforma 1 se hace operativa para dar cabida a mayores demandas asociadas con funciones metabólicas específicas.

Debido a que el glutamato es cotransportado con un H⁺ por el GC, y por lo tanto su distribución a través de la membrana mitocondrial es dependiente del ΔpH, la entrada de glutamato se ve favorecida en las mitocondrias energizadas. Sin embargo, cuando se genera

glutamato intramitocondrialmente (por ejemplo, por oxidación de prolina), el GC puede operar en la dirección inversa para limitar la acumulación de glutamato intramitocondrial.

La primera mutación conocida de GC1, una sustitución de la prolina 206 con leucina, se encontró en una familia consanguínea árabe con 4 de los 8 niños afectados (101). Una segunda mutación (un cambio de glicina 236 a triptófano) se identificó en una familia consanguínea de Argelia, con un niño afectado de 3 hermanos (L. Colleaux y Palmieri F., datos no publicados). Todos los individuos afectados son homocigotos para las mutaciones mencionadas, mientras que los padres eran heterocigotos.

Los síntomas de los niños afectados de ambas familias era similar: convulsiones mioclónicas resistentes a tratamiento de aparición muy temprana, hipotonía, microcefalia progresiva, trastornos de la conducción del nervio óptico, y rápida evolución a encefalopatía y espasticidad. La epilepsia mioclónica neonatal se caracteriza por un patrón de EEG típico con supresión de golpe y por un potencial evocado visual anormal con una señal de baja amplitud y respuesta lenta.

En las sustituciones P206L y G236W, que se encuentran en H4 y H5 a dos y tres vueltas de hélice del lado de la membrana citosólica, respectivamente, se alteran residuos muy conservados en los transportadores de aspartato/glutamato y de glutamato en el hombre y en otras especies y aboliendo el transporte de glutamato en liposomas reconstituidos. En fibroblastos de pacientes, permeabilizados con digitonina, la oxidación de glutamato fue también muy deficiente (101 y datos no publicados).

Estos resultados, han proporcionado la primera evidencia de que, a pesar de una fosforilación oxidativa normal, la alteración de las importaciones/metabolismo de glutamato mitocondrial conduce a una alteración de la excitabilidad neuronal.

Aunque la patogenia de la epilepsia mioclónica neonatal sigue siendo una cuestión abierta, es destacable lo siguiente:

(i) Durante el desarrollo fetal, GC1 se expresa primero en el cerebro, específicamente dentro de los territorios que contribuyen a la génesis y el control de las crisis mioclónicas (101),

(ii) La expresión de GC1 es mucho mayor en los astrocitos que en las neuronas (103),

(iii) Las mitocondrias de los astrocitos no tienen el transportador aspartato/glutamato (104) y por lo tanto el glutamato sólo puede entrar en las mitocondrias de los astrocitos a través del transportador del glutamato,

(iv) El glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitadores;

(v) después de su liberación en la sinapsis, el glutamato es captado por los astrocitos. Es posible que la epilepsia dependiente de GC1 sea debida a un defecto de transporte de glutamato mitocondrial en los astrocitos, que en consecuencia conduciría a un aumento en la concentración de glutamato intrasináptico.

No existe un tratamiento eficaz para la epilepsia mioclónica neonatal, los niños afectados mueren en 1 ó 2 años después del nacimiento y de sobrevivir lo hacen en un estado vegetativo. Algunos casos graves de la enfermedad pueden confundirse con convulsiones febriles, que son de menor duración y se repiten con menos frecuencia. Es importante distinguir la epilepsia mioclónica neonatal de los mioclonos del sueño neonatales benignos. Esta última condición se observa en lactantes sanos, se producen sólo en el sueño, y el EEG es normal.

Aparte de los errores metabólicos, pueden ser causa de síndromes EME las agresiones perinatales y malformaciones cerebrales. Una punción lumbar puede ser útil para ayudar a descartar otras enfermedades neurodegenerativas.

Polineuropatía progresiva con necrosis estriatal bilateral

Recientemente, se ha identificado en cuatro pacientes de 7-20 años nacidos de padres consanguíneos una degeneración bilateral del estriado con polineuropatía progresiva ligada al SLC25A19 (Spiegel et al., 2009). El fenotipo de estos pacientes, pese a implicar el mismo locus y transportador, es muy diferente al de la microcefalia de los Amish.

Este trastorno, se caracteriza por episodios agudos de encefalopatía asociada con necrosis estriatal, sin afectar el globo pálido, en imágenes del cerebro, así como una polineuropatía crónica progresiva. El desarrollo psicomotor en un principio normal, se sigue de la aparición de crisis de encefalopatía aguda episódica infantil, asociadas con fiebre inespecífica, debilidad muscular y letargo, dando lugar a parálisis, arreflexia y disartria. Estos remiten completamente y sin pérdida de desarrollo psicomotor, aunque suele dejar una debilidad distal leve residual. Aparece un leve aumento de lactato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) durante la fase aguda.

La enfermedad está causada por la mutación c.373G>A que altera la Gly125 convirtiéndola en serina (G125S), en el primer residuo de la tercera alfa-hélice transmembrana de SLC25A19. Los síntomas más leves y hallazgos bioquímicos han sugerido que la mutación G125S es menos perjudicial para el transporte ThPP que la mutación G177A en los Amish (Spiegel et al., 2009).

Anemia sideroblástica congénita

Otro de los errores del metabolismo, es la anemia sideroblástica congénita, causada por defectos en el gen SLC25A38 (105). Como su nombre indica, esta enfermedad se caracteriza por una anemia microcítica hipocroma grave anemia grave con hipocromía, microcitosis y sideroblastos en anillo en la médula ósea (normoblastos anormales con sobrecarga de hierro en la mitocondria). Los pacientes no presentan una clínica asociada a otros síndromes y no presentan tampoco anomalías del desarrollo. La sintomatología es muy similar a la causada por un defecto de ALA sintasa-2 que codifica la ALA sintasa intramitocondrial específica eritroide.

Para dilucidar la patogénesis de la alteración de la anemia sideroblástica congénita ligada a SLC25A38, se encontró que (i) el silenciamiento de los dos genes SLC25A38 homólogos (*slc25a38a* y *slc25a38b*) en pez cebra dio lugar a embriones con anemia, y (ii) el mutante nulo (YDL119C) de SLC25A38 de *S. cerevisiae* no crecía en glicerol, fue incapaz de reducir el sodionitroprusiato (que requiere ferriredutasa dependiente de heme) y mostró un contenido significativamente menor de ALA.

Hasta ahora, 11 alteraciones en SLC25A38, entre ellas cuatro mutaciones con sentido cambiado, se han encontrado en pacientes en los que fueron excluidas mutaciones en los genes de ALAS-2 (delta-aminolevulinato sintasa-2) ligada a X (105). De hecho, ALAS-2, que codifica la delta-aminolevulinato sintasa, específica eritroide y localizada intramitocondrialmente, es el único gen conocido, además de SLC25A38, capaz de causar anemia sideroblástica congénita no sindrómica.

La presencia de un dipéptido arginina-aspartato en el punto II de contacto de SLC25A38p sugiere que esta proteína es un transportador de aminoácidos. Sobre esta base, se plantea la hipótesis de que SLC25A38p puede tanto importar glicina a las mitocondrias como intercambiar glicina citosólica por ácido delta-amino-levulínico mitocondrial a través de la membrana mitocondrial (105), es decir, transporta uno de los sustratos y el producto de la primera etapa en la biosíntesis del hemo catalizada por ALAS-2, lo que explica la

característica principal de la enfermedad, es decir, la alteración de la producción de hemo en las células eritroides.

Curiosamente, entre las 48 mutaciones con sentido cambiado encontradas hasta ahora en pacientes afectados por enfermedades asociadas a los MCs (37, 76, 105), 30 se refieren a los residuos que se proyectan hacia la cavidad interna del transportador. Estas 30 mutaciones se encuentran en las siguientes regiones (Figura 11): puerta de la matriz (7); sitio de unión a sustrato (10); nivel 1 de P-G (8); nivel 2 de P-G (2); puerta citosólica (3).

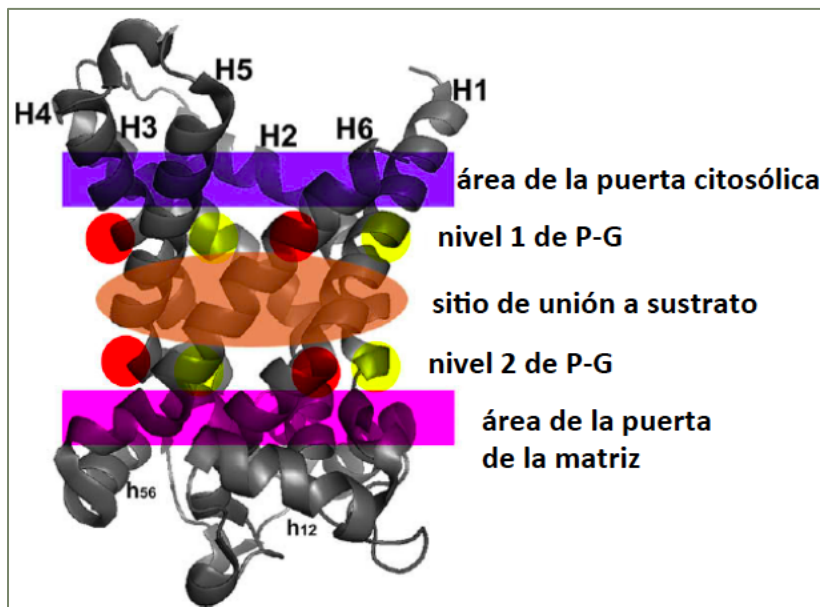


Figura 11.- Áreas estructurales del MC en las que se encuentran muchas mutaciones con cambio de sentido causantes de enfermedades

Se muestra la estructura cristalina en 3D del complejo transportador ADP/ATP-carboxiatractilósido (sin el inhibidor) con las siguientes regiones en el color: puerta citosólica (azul); sitio de unión a sustrato (naranja), y puerta de la matriz (púrpura). En los niveles 1 de P-G y 2 de P-G, las prolinas se muestran en rojo y en amarillo las glicinas. (Modificado de F.Palmieri, C.L.Pierri: FEBS Letters: 584, (2010) 1931-1939).

CONCLUSIONES

Desde que en 1997, la deficiencia del transportador de carnitina-acilcarnitina se asoció al gen nuclear de SLC25A20, ha aumentado rápidamente el número de defectos genéticos nucleares estudiados que alteran la función de transportadores mitocondriales de metabolitos.

En los últimos años, se han realizado progresos importantes en la caracterización de MCs funcional y estructuralmente. Mediante la utilización de un inhibidor único y poderoso, se produjo un gran avance en este campo en 2003, cuando la estructura 3D del transportador de ADP/ATP inhibido por carboxiatractilósido se dio a conocer (18) el cual, entre otros resultados, ha ayudado en la interpretación de muchos de los datos estructurales y funcionales.

Esto, fue seguido por otros avances en la comprensión del mecanismo funcional de los MCs, como la identificación de sitios de unión a sustratos localizados de forma similar basado en el conocimiento de la especificidad por el sustrato de las subfamilias de transporte, modelos de homología y el análisis de alineación de secuencias múltiples. Sin embargo, aún queda mucho por aprender, lo más importante, la estructura precisa de los transportadores no inhibidos en diferentes conformaciones. Se cree que las dificultades encontradas en la cristalización de los MCs en las condiciones anteriores se superará en el futuro al mejorar la calidad de las proteínas estudiadas.

Hasta la fecha, han sido bien caracterizadas bioquímica y genéticamente casi una decena de enfermedades relacionadas con transportadores mitocondriales. Este nuevo grupo de enfermedades contribuye a una expansión actual del campo de los trastornos mitocondriales, junto a aquellos relacionados con la disfunción de la cadena respiratoria.

En la última década, el número de enfermedades mitocondriales causadas por defectos de componentes del proteoma mitocondrial codificados por genes nucleares ha estado creciendo espectacularmente para justificar lo que ahora se conoce como "medicina mitocondrial".

A pesar de los importantes avances que se han realizado en nuestra comprensión de las bases moleculares de las enfermedades mitocondriales asociadas a transportadores, no se dispone aún de una terapéutica etiológica.

El tratamiento actual es sintomático y de las complicaciones de la enfermedad. Sin embargo, algunas enfermedades asociadas a transportadores de mitocondrias, al igual que otros trastornos metabólicos, se benefician enormemente de las medidas dietéticas.

La gestión eficaz de la enfermedad debe incluir una difusión más amplia de la evaluación del recién nacido y la estrecha colaboración entre los médicos, genetistas y expertos en enfermedades metabólicas en centros especializados.

La terapia preventiva a través del asesoramiento genético y diagnóstico prenatal es esencial y ya hay disponibilidades.

Mientras esperamos que la terapia genética esté disponible para su aplicación práctica, es necesaria la comprensión de los mecanismos patogénicos a través de un enfoque multidisciplinario que combine los experimentos in vitro con estudios in vivo en pacientes, modelos celulares y animales, para ayudar a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que pueden ser útiles a este grupo de trastornos metabólicos. Estudios adicionales parecen ayudar a revelar nuevas enfermedades relacionadas con los transportadores mitocondriales (particularmente en vista del hecho de que la función de unos 20 genes humanos de la familia SLC25 está por identificar) y proporcionar nuevos conocimientos en este campo excitante.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con financiación de la Universidad de Bari, becas del Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR) (FIRB y PRIN), Ministero della Salute, Región de Apulia Neurobiotech (PS 124), Centro de Excelencia en Genómica (CEGBA) y contratos de la Comunidad Europea LSHM-CT-2004-503116 e Italian Human ProteomeNet No.RBRNB07BMCT_009 (MUIR), Comité Telethon Fundación Onlus No. GGP11139.

ABREVIATURAS

AAC	transportador ADP/ATP ·
AGC	transportador aspartato/glutamato ·
ANC	transportador peroxisomal de nucleótidos de adenina ·
BKA	ácido bongkrecico ·
CAC	transportador carnitina/acilcarnitina ·
CATR	carboxiatractilosido ·
CoA	coenzima A ·
CIC	transportador de citrato ·
DIC	transportador de dicarboxilato ·
DNC	transportador de desoxinucleótidos ·
GC	transportador de glutamato ·
GDC	transportador de la enfermedad de Graves · ·
MC	transportador mitocondrial ·
MCF	familia de transportadores mitocondriales ·
MIM	Herencia Mendeliana en el Hombre
MMI	membrana mitocondrial interna
MTSEA	(2-aminoetil)-metanotiosulfonate hidrobromuro ·
OAA	oxalacetato ·
ODC	transportador de oxodicarboxilato (cetodicarboxilato)·
OGC	transportador de cetoglutarato (oxoglutarato)·
OMIM	Herencia Mendeliana en el Hombre Online (base de datos) ·
ORC	transportador de ornitina ·
PEP	fosfoenolpiruvato ·
PiC	transportador de Pi (fosfato) ·
SLC25	nombre de la familia de genes humanos de transportadores mitocondriales de solutos, asignado por el comité de nomenclatura de la Organización del Genoma Humano (HUGO) ·
TMS	segmento transmembrana
TPC	transportador de ThPP (pirofosfato de tiamina)
UCP	proteína desacoplante

BIBLIOGRAFÍA

1. I.J. Holt, A.E. Harding, J.A. Morgan-Hughes (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331, 717–719.
2. D.C. Wallace, G. Singh, M.T. Lott, J.A. Hodge, T.G. Schurr, A.M. Lezza, L.J. Elsas II, E.K. Nikoskelainen (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242, 1427–1430.
3. P. Rustin, T. Bourgeron, B. Parfait, D. Chretien, A. Munnich, A. Rötig (1997) Inborn errors of the Krebs cycle: a group of unusual mitochondrial diseases in human. *Biochim. Biophys. Acta* 1361, 185–197.
4. P. Rinaldo, D. Matern, M.J. Bennett (2002) Fatty acid oxidation disorders *Annu. Rev. Physiol.* 64, 477–5025.
5. M. Schlame, J.A. Towbin, P.M. Heerdt, R. Jehle, S. DiMauro, T.J. Blanck (2002) Deficiency of tetralinoleoyl-cardiolipin in Barth síndrome. *Ann. Neurol.* 51, 634–637.
6. F. Valianpour, R.J. Wanders, H. Overmars, P. Vreken, A.H. Van Gennip, F. Baas, B. Plecko, R. Santer, K. Becker, P.G. Barth (2002) Cardiolipin deficiency in X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome, MIM 302060): a study in cultured skin fibroblasts. *J. Pediatr.* 141, 729–733.
7. I. Napier, P. Ponka, D.R. Richardson (2005) Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood* 105, 1867–1874.
8. A.G. Estévez, J.P. Crow, J.B. Sampson, C. Reiter, Y. Zhuang, G.J. Richardson, M.M. Tarpey, L. Barbeito, J.S. Beckman (1999) Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science* 286, 2498–2500.
9. J.A. MacKenzie, R.M. Payne (2007) Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 509–523.
10. S.A. Detmer, D.C. Chan (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 870–879.
11. P. Rustin (2002) Mitochondria, from cell death to proliferation. *Nat. Genet.* 30, 352–353.
12. M. Brandon, P. Baldi, D.C. Wallace (2006) Mitochondrial mutations in cáncer. *Oncogene* 25, 4647–4662.
13. A. Voza, E. Blanco, L. Palmieri, F. Palmieri (2004) Identification of the mitochondrial GTP/GDP transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, pp. 20850–20857.
14. M. Saraste, J. Walker (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett.* 144, 250–254.

15. C. Indiveri, V. Iacobazzi, N. Giangregorio, F. Palmieri (1997) The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Biochem. J.* 321, 713–719.
16. F. Palmieri (1994) Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett.* 346, 48–54.
17. L. Capobianco, F. Bisaccia, A. Michel, F.S. Sluse, F. Palmieri (1995) The N- and C-termini of the tricarboxylate carrier are exposed to the cytoplasmic side of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett.* 357, 297–300.
18. E. Pebay-Peyroula, C. Dahout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trézéguet, G. Lauquin, G. Brandolin (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426, 39–44.
19. D.R. Nelson, C.M. Felix, J.M. Swanson (1998) Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol.* 277, 285–308.
20. F. Palmieri, C.L. Pierri, A. De Grassi, A. Nunes-Nesi, A.R. Fernie (2011) Evolution structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J.* 66, 161–181.
21. E.R.S. Kunji, M. Harding (2003) Projection structure of the atractyloside-inhibited mitochondrial ADP/ATP carrier of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 36985–36988.
22. F. Palmieri (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications in: M.A. Hediger (Ed.), *The ABC of solute carriers*. *Pflügers Arch.- Eur. J. Physiol.* 447 pp. 689–709.
23. A.R. Cappello, D.V. Miniero, R. Curcio, A. Ludovico, L. Daddabbo, I. Stipani, A.J. Robinson, E.R.S. Kunji, F. Palmieri (2007) Functional and structural role of amino acid residues in the odd-numbered transmembrane α -helices of the bovine mitochondrial oxoglutarate carrier. *J. Mol. Biol.* 369, 400–412.
24. A. Robinson, E. Kunji (2006) Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2617–2622.
25. A.J. Robinson, C. Overy, E.R.S. Kunji (2008) The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 17766–17771.
26. F. Palmieri, C.L. Pierri (2010) Structure and function of mitochondrial carriers: role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. *FEBS Lett.* 584, 1931–1939.
27. D. Nelson, J. Lawson, M. Klingenberg, M. Douglas (1993) Site-directed mutagenesis of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator. Six arginines and one lysine are essential. *J. Mol. Biol.* 230, 1159–1170.

28. V. Müller, D. Heidkämper, D. Nelson, M. Klingenberg (1997) Mutagenesis of some positive and negative residues occurring in repeat triad residues in the ADP/ATP carrier from yeast. *Biochemistry* 36, 16008–16018.
29. K. Echtay, E. Winkler, M. Bienengraeber, M. Klingenberg (2000) Site-directed mutagenesis identifies residues in uncoupling protein (UCP1) involved in three different functions. *Biochemistry* 39, 3311–3317.
30. K. Echtay, M. Bienengraeber, M. Klingenberg (2001) Role of intrahelical arginine residues in functional properties of uncoupling protein (UCP1). *Biochemistry* 40, 5243–5248.
31. C. Indiveri, N. Giangregorio, V. Iacobazzi, F. Palmieri (2002) Site-directed mutagenesis and chemical modification of the six native cysteine residues of the rat mitochondrial carnitine carrier: Implications for the role of cysteine-136. *Biochemistry* 41, 8649–8656.
32. H. Wohlrab, V. Annese, A. Haefele (2002) Single replacement constructs of all hydroxyl, basic, and acidic amino acids identify new function and structure-sensitive regions of the mitochondrial phosphate transport protein. *Biochemistry* 41, 3254–3261.
33. A. Cappello, R. Curcio, D.V. Miniero, I. Stipani, A. Robinson, E. Kunji, F. Palmieri (2006) Functional and structural role of amino acid residues in the even-numbered transmembrane alpha-helices of the bovine mitochondrial oxoglutarate carrier. *J. Mol. Biol.* 363, 51–62.
34. C. Ma, S. Remani, J. Sun, R. Kotaria, J. Mayor, D. Walters, R. Kaplan (2007) Identification of the substrate binding sites within the yeast mitochondrial citrate transport protein. *J. Biol. Chem.* 282, 17210–17220.
35. M. González-Barroso, I. Giurgea, F. Bouillaud, A. Anedda, C. Bellanné-Chantelot, L. Hubert, Y. de Keyser, P. de Lonlay, D. Ricquier (2008) Mutations in UCP2 in congenital hyperinsulinism reveal a role for regulation of insulin secretion. *PLoS One* 3, e3850.
36. J. De Lucas, C. Indiveri, A. Tonazzi, P. Perez, N. Giangregorio, V. Iacobazzi, F. Palmieri (2008) Functional characterization of residues within the carnitine/acylcarnitine translocase RX2PANAAAXF distinct motif. *Mol. Membr. Biol.* 25, 152–163.
37. F. Palmieri (2008) Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 564–578.
38. M. Klingenberg (1976) The ADP/ATP carrier in mitochondrial membranes A.N. Martonosi (Ed.), *The Enzymes of Biological Membranes: Membrane Transport*, Vol. 3 Plenum Publishing Corp., New York/London pp. 383–438.
39. M. Klingenberg (2008) The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1978–2021.

40. C. Indiveri, A. Tonazzi, F. Palmieri (1994) The reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. Evidence for a transport mechanism different from that of the other mitochondrial translocators. *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 65–73.
41. F. Dehez, E. Pebay-Peyroula, C. Chipot (2008) Binding of ADP in the mitochondrial ADP/ATP carrier is driven by an electrostatic funnel. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 12725–12733.
42. Y. Wang, E. Tajkhorshid (2008) Electrostatic funneling of substrate in mitochondrial inner membrane carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 9598–9603.
43. M. Klingenberg (1991) Mechanistic and energetic aspects of carrier catalysis – Exemplified with mitochondrial translocators. S.A. Kuby (Ed.), *A Study of Enzymes. Mechanism of Enzyme Action*, vol. II CRC Press, Boca Raton/Ann Arbor/Boston 367–388.
44. M. Klingenberg (2005) Ligand–protein interaction in biomembrane carriers. The induced transition fit of transport catalysis. *Biochemistry* 44, 8563–8570.
45. L. Bamber, M. Harding, M. Monné, D.-J. Slotboom, E.R.S. Kunji (2007) The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10830–10834.
46. L. Palmieri, S. Alberio, I. Pisano, T. Lodi, M. Meznaric Petrusa, J. Zidar, A. Santoro, P. Scarcia, F. Fontanesi, E. Lamantea, I. Ferrero, M. Zeviani (2005) Complete loss-of-function of the heart-/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3079–3088.
47. A.R. Curran, D.M. Engelman (2003) Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13, 412–417.
48. B.H. Graham, K.G. Waymire, B. Cottrell, I.A. Trounce, G.R. MacGregor, D.C. Wallace (1997) A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat. Genet.*, 16, 226–234.
49. G. Fiermonte, J.E. Walker, F. Palmieri (1993) Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria. *Biochem J.* 294, 293–299.
50. J.A. Mayr, O. Merkel, S.D. Kohlwein, B.R. Gebhardt, H. Böhles, U. Fötschl, J. Koch, M. Jaksch, H. Lochmüller, R. Horváth, P. Freisinger, W. Sperl (2007) Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: a novel disorder of oxidative phosphorylation. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 478–484.
51. V. Dolce, V. Iacobazzi, F. Palmieri, J.E. Walker (1994) The sequences of human and bovine genes of the phosphate carrier from mitochondria contain evidence of alternatively spliced forms. *J. Biol. Chem.* 269, 10451–10460.
52. G. Fiermonte, V. Dolce, F. Palmieri (1998) Expression in *Escherichia coli*, functional characterization, and tissue distribution of isoforms A and B of the phosphate carrier from bovine mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 273, 22782–22787.

53. V. Dolce, G. Fiermonte, F. Palmieri (1996) Tissue-specific expression of the two isoforms of the mitochondrial phosphate carrier in bovine tissues. *FEBS Lett.* 399, 95–98.
54. J. Kaukonen, J.K. Juselius, V. Tiranti, A. Kyttälä, M. Zeviani, G.P. Comi, S. Keränen, L. Peltonen, A. Suomalainen (2000) Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289, 782–785.
55. G. Van Goethem, B. Dermaut, A. Löfgren, J.J. Martin, C. Van Broeckhoven (2001) Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat. Genet.* 28, pp. 211–212.
56. J.N. Spelbrink, F.Y. Li, V. Tiranti, K. Nikali, Q.P. Yuan, M. Tariq, S. Wanrooij, N. Garrido, G. Comi, L. Morandi, L. Santoro, A. Toscano, G.M. Fabrizi, H. Somer, R. Croxen, D. Beeson, J. Poulton, A. Suomalainen, H.T. Jacobs, M. Zeviani, C. Larsson (2001) Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat. Genet.* 28, 223–231.
57. F. Fontanesi, L. Palmieri, P. Scarcia, T. Lodi, C. Donnini, A. Limongelli, V. Tiranti, M. Zeviani, I. Ferrero, A.M. Viola (2004) Mutations in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum. Mol. Genet.* 13, 923–934.
58. M. Huizing, V. Iacobazzi, L. Ijlst, P. Savelkoul, W. Ruitenbeek, L.P. van den Heuvel, C. Indiveri, J. Smeitink, F.J.M. Trijbels, R.J.A. Wanders, F. Palmieri (1997) Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA, and identification of the molecular defect in a patient. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 1239–1245.
59. V. Iacobazzi, M.A. Naglieri, C.A. Stanley, R.J.A. Wanders, F. Palmieri (1998) The structure and organization of the human carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 770–774.
60. F. Palmieri, C.L. Pierri (2010) Mitochondrial metabolite transport. *Essays in Biochemistry* 47, 37–52.
61. J.R. de Lucas, C. Indiveri, A. Tonazzi, P. Perez, N. Giangregorio, V. Iacobazzi, F. Palmieri (2008) Functional characterisation of residues within the carnitine/acylcarnitine translocase RX2PANAAXF distinct motif. *Mol. Membr. Biol.* 25, 152–163.
62. C.A. Stanley, D.E. Hale, G.T. Berry, S. Deleeuw, J. Boxer, J.P. Bonnefont (1992) Brief report: a deficiency of carnitine-acylcarnitine translocase in the inner mitochondrial membrane. *New Engl. J. Med.* 327, 19–23.
63. S.V. Pande, M. Brivet, A. Slama, F. Demaugre, C. Aufrant, J.M. Saudubray (1993) Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency with severe hypoglycemia and auriculo ventricular block. Translocase assay in permeabilized fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 91, 1247–1252.

64. V. Iacobazzi, F. Invernizzi, S. Baratta, R. Pons, W. Chung, B. Garavaglia, C. Dionisi-Vici, A. Ribes, R. Parini, M.D. Huertas, S. Roldan, G. Lauria, F. Palmieri, F. Taroni (2004) Molecular and functional analysis of SLC25A20 mutations causing carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Hum. Mutat.* 24, 312–320.
65. L. IJlst, C.W. van Roermund, V. Iacobazzi, W. Oostheim, J.P. Ruiter, J.C. Williams, F. Palmieri, R.J. Wanders (2001) Functional analysis of mutant human carnitine acylcarnitine translocases in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 700–706.
66. P. Pérez, O. Martínez, B. Romero, I. Olivas, A.M. Pedregosa, F. Palmieri, F. Laborda, J.R. De Lucas (2003) Functional analysis of mutations in the human carnitine/acylcarnitine translocase in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 39, 211–220.
67. J.A. Camacho, C. Obie, B. Biery, B.K. Goodman, C.A. Hu, S. Almashanu, G. Steel, R. Casey, M. Lambert, G.A. Mitchell, D. Valle (1999) Hyperornithinaemia–hyperammonaemia–homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat. Genet.* 22, 151–158.
68. L. Palmieri, V. De Marco, V. Iacobazzi, F. Palmieri, M.J. Runswick, J.E. Walker (1997) Identification of the yeast ARG-11 gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis. *FEBS Lett.* 410, 447–451.
69. G. Fiermonte, V. Dolce, L. David, F.M. Santorelli, C. Dionisi-Vici, F. Palmieri, J.E. Walker (2003) The mitochondrial ornithine transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J. Biol. Chem.* 278, 32778–32783.
70. F.C. Kuo, W.L. Hwu, D. Valle, J.E. Darnell Jr. (1991) Colocalization in pericentral hepatocytes in adult mice and similarity in developmental expression pattern of ornithine aminotransferase and glutamine synthetase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9468–9472.
71. C. Indiveri, A. Tonazzi, I. Stipani, F. Palmieri (1997) The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria: electrical nature and coupling of the exchange reaction with H⁺ translocation. *Biochem. J.* 327, 349–355.
72. S. Salvi, F.M. Santorelli, E. Bertini, R. Boldrini, C. Meli, A. Donati, A.B. Burlina, C. Rizzo, M. Di Capua, G. Fariello, C. Dionisi-Vici (2001) Clinical and molecular findings in hyperornithinemia–hyperammonemia–homocitrullinuria syndrome. *Neurology* 57, 911–914.
73. J. Camacho, R. Mardach, N. Rioseco-Camacho, E. Ruiz-Pesini, O. Derbeneva, D. Andrade, F. Zaldivar, Y. Qu, S.D. Cederbaum (2006) Clinical and functional characterization of a human ORNT1 mutation (T32R) in the hyperornithinemia–hyperammonemia–homocitrullinuria (HHH) syndrome. *Pediatr. Res.* 60, 423–429.

74. V.E. Shih, M.L. Efron, H.W. Moser (1969) Hyperornithinemia, hyperammonemia, and homocitrullinuria. A new disorder of amino acid metabolism associated with myoclonic seizures and mental retardation. *Am. J. Dis. Child.* 117, 83–92.
75. A. Tessa, G. Fiermonte, C. Dionisi-Vici, E. Paradies, M.R. Baumgartner, Y.H. Chien, S. Fecarotta, C. Loguercio, H. Ogier de Baulny, M.C. Nassogne, F. Deodato, G. Parenti, S.L. Rutledge, M.A. Villaseca, G. Scarano, C.L. Pierri, F. Palmieri, F.M. Santorelli (2009) Identification of novel mutations in the SLC25A15 gene in hyperornithinemia, hyperammonemia, and homocitrullinuria (HHH) syndrome: a clinical, molecular and functional study. *Hum Mutat.* 30, 741–748.
76. R. Wibom, F.M. Lasorsa, V. Töhhönen, M. Barbaro, F.H. Sterky, T. Kucinski, K. Naess, M. Jonsson, C.L. Pierri, F. Palmieri, A. Wedell (2009) AGC1 deficiency associated with global cerebral hypomyelination. *N. Engl. J. Med.* 361, 489–495.
77. M.A. Jalil, L. Begum, L. Contreras, B. Pardo, M. Iijima, M.X. Li, M. Ramos, P. Marmol, M. Horiuchi, K. Shimotsu, S. Nakagawa, A. Okubo, M. Sameshima, Y. Isashiki, A. Del Arco, K. Kobayashi, J. Satrustegui, T. Saheki. (2005) Reduced N-acetylaspargate levels in mice lacking aralar, a brain- and muscle-type mitochondrial aspartate-glutamate carrier. *J. Biol. Chem.* 280, 31333–31339.
78. L. Palmieri, B. Pardo, F.M. Lasorsa, A. del Arco, K. Kobayashi, M. Iijima, M.J. Runswick, J.E. Walker, T. Saheki, J. Satrustegui, F. Palmieri (2001) Citrin and aralar1 are Ca^{2+} -stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J.* 20, 5060–5069.
79. Y.B. Lu, K. Kobayashi, M. Ushikai, A. Tabata, M. Iijima, M.X. Li, L. Lei, K. Kawabe, S. Taura, Y. Yang, T.T. Liu, S.H. Chiang, K.J. Hsiao, Y.L. Lau, L.C. Tsui, D.H. Lee, T. Saheki (2005) Frequency and distribution in East Asia of 12 mutations identified in the SLC25A13 gene of Japanese patients with citrin deficiency. *J. Hum. Genet.* 50, 338–346.
80. K. Kobayashi, D.S. Sinasac, M. Iijima, A.P. Boright, L. Begum, J.R. Lee, T. Yasuda, S. Ikeda, R. Hirano, H. Terazono, M.A. Crackower, I. Kondo, L.C. Tsui, S.W. Scherer, T. Saheki (1999) The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat. Genet.* 22, 159–163.
81. C. Indiveri, R. Krämer, F. Palmieri (1987) Reconstitution of the malate/aspartate shuttle from mitochondria. *J Biol Chem.* 262,15979-15983.
82. A. del Arco, M. Agudo, J. Satrustegui (2000) Characterization of a second member of the subfamily of calcium-binding mitochondrial carriers expressed in human non-excitable tissues. *Biochem. J.* 345, 725–732.
83. M. Iijima, A. Jalil, L. Begum, T. Yasuda, N. Yamaguchi, M. Xian Li, N. Kawada, H. Endou, K. Kobayashi, T. Saheki (2001) Pathogenesis of adult-onset type II citrullinemia caused by deficiency of citrin, a mitochondrial solute carrier protein: tissue and subcellular localization of citrin. *Adv. Enzyme Regul.* 41, 325–342.

84. F.M. Lasorsa, P. Pinton, L. Palmieri, G. Fiermonte, R. Rizzuto, F. Palmieri (2003) Recombinant expression of the Ca²⁺-sensitive aspartate/glutamate carrier increases mitochondrial ATP production in agonist-stimulated Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 278, 38686–38692.
85. K. Kobayashi, N. Shaheen, R. Kumashiro, K. Tanikawa, W.E. O'Brien, A.L. Beaudet, T. Saheki (1993) A search for the primary abnormality in adult-onset type II citrullinemia. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 1024–1030.
86. K. Kobayashi, H. Kakinoki, T. Fukushige, N. Shaheen, H. Terazono, T. Saheki (1995) Nature and frequency of mutations in the argininosuccinate synthetase gene that cause classical citrullinemia. *Hum. Genet.* 96, 454–463.
87. T. Ohura, K. Kobayashi, Y. Tazawa, I. Nishi, D. Abukawa, O. Sakamoto, K. Iinuma, T. Saheki (2001) Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia. *Hum. Genet.* 108, 87–90.
88. D. Dimmock, K. Kobayashi, M. Iijima, A. Tabata, L.J. Wong, T. Saheki, B. Lee, F. Scaglia (2007) Citrin deficiency: a novel cause of failure to thrive that responds to a high-protein, low-carbohydrate diet. *Pediatrics* 119, 773–777.
89. T. Yasuda, N. Yamaguchi, K. Kobayashi, I. Nishi, H. Horinouchi, M.A. Jalil, M.X. Li, M. Ushikai, M. Iijima, I. Kondo, T. Saheki (2000) Identification of two novel mutations in the SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type II citrullinemia. *Hum. Genet.* 107, 537–545.
90. G. Fiermonte, D. Soon, A. Chaudhuri, E. Paradies, P.J. Lee, S. Krywawych, F. Palmieri, R.H. Lachmann (2008) An adult with type II citrullinemia presenting in Europe. *New Engl. J. Med.* 338, 1408–1409.
91. M.L. Verdonk, J.C. Cole, M.J. Hartshorn, C.W. Murray, R.D. Taylor (2003) Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* 52, 609–623.
92. D.S. Sinasac, M. Moriyama, M.A. Jalil, L. Begum, M.X. Li, M. Iijima, M. Horiuchi, B.H. Robinson, K. Kobayashi, T. Saheki, L.C. Tsui (2004) Slc25a13-knockout mice harbor metabolic deficits but fail to display hallmarks of adult-onset type II citrullinemia. *Mol. Cell. Biol.* 24, 527–536.
93. T. Saheki, M. Iijima, M.X. Li, K. Kobayashi, M. Horiuchi, M. Ushikai, F. Okumura, X.J. Meng, I. Inoue, A. Tajima, M. Moriyama, K. Eto, T. Kadowaki, D.S. Sinasac, L.C. Tsui, M. Tsuji, A. Okano, T. Kobayashi (2007) Citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mice recapitulate features of human citrin deficiency. *J. Biol. Chem.* 282, 25041–25052.
94. M. Moriyama, M.X. Li, K. Kobayashi, D.S. Sinasac, Y. Kannan, M. Iijima, M. Horiuchi, L.C. Tsui, M. Tanaka, Y. Nakamura, T. Saheki (2006) Pyruvate ameliorates the defect in ureogenesis from ammonia in citrin-deficient mice. *J. Hepatol.* 44, 930–938.

95. R.I. Kelley, D. Robinson, E.G. Puffenberger, K.A. Strauss, D.H. Morton (2002) Amish lethal microcephaly: a new metabolic disorder with severe congenital microcephaly and 2-ketoglutaric aciduria. *Am. J. Med. Genet.* 112, 318–326
96. M.J. Rosenberg, R. Agarwala, G. Bouffard, J. Davis, G. Fiermonte, M.S. Hilliard, T. Koch, L.M. Kalikin, I. Makalowska, D.H. Morton, E.M. Petty, J.L. Weber, F. Palmieri, R.I. Kelley, A.A. Schäffer, L.G. Biesecker (2002) Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly. *Nat. Genet.* 32, 175–179.
97. V. Dolce, F. Fiermonte, M.J. Runswick, F. Palmieri, J.E. Walker (2001) The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in toxicity of nucleoside antivirals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, pp. 2284–2288.
98. M.J. Lindhurst, G. Fiermonte, S. Song, E. Struys, F. De Leonardis, P.L. Schwartzberg, A. Chen, A. Castegna, N. Verhoeven, C.K. Mathews, F. Palmieri, L.G. Biesecker (2006) Knockout of *Slc25a19* causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15927–15932.
99. V. Iacobazzi, M. Ventura, G. Fiermonte, G. Prezioso, M. Rocchi, F. Palmieri (2001) Genomic organization and mapping of the gene (*SLC25A19*) encoding the human mitochondrial deoxynucleotide carrier (DNC). *Cytogenet. Cell Genet.* 93, 40–42.
100. A.R. Cappello, R. Curcio, D.V. Miniero, I. Stipani, A.J. Robinson, E.R.S. Kunji, F. Palmieri (2006) Functional and structural role of amino acid residues in the even-numbered transmembrane α -helices of the bovine mitochondrial oxoglutarate carrier. *J. Mol. Biol.* 363, 51–62.
101. F. Molinari, A. Raas-Rothschild, M. Rio, G. Fiermonte, F. Encha-Razavi, L. Palmieri, F. Palmieri, Z. Ben-Neriah, N. Khadom, M. Vekemans, T. Attié-Bitach, A. Munnich, P. Rustin, L. Colleaux (2005) Impaired mitochondrial glutamate transport in autosomal recessive neonatal myoclonic epilepsy. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 334–339.
102. G. Fiermonte, L. Palmieri, S. Todisco, G. Agrimi, F. Palmieri, J.E. Walker (2002) Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms. *J. Biol. Chem.* 277, 19289–19294
103. D.A. Berkich, M.S. Ola, J. Cole, A.J. Sweatt, S.M. Hutson, K.F. LaNoue (2007) Mitochondrial transport proteins of the brain. *J. Neurosci. Res.* 85, 3367–3377.
104. M. Ramos, A. del Arco, B. Pardo, A. Martínez-Serrano, J.R. Martínez-Morales, K. Kobayashi, T. Yasuda, E. Bogóñez, P. Bovolenta, T. Saheki, J. Satrustegui (2003) Developmental changes in the Ca^{2+} -regulated mitochondrial aspartate-glutamate carrier *aralar1* in brain and prominent expression in the spinal cord. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 143, 33–46
105. D.L. Guernsey, H. Jiang, D.R. Campagna, S.C. Evans, M. Ferguson, M.D. Kellogg, M. Lachance, M. Matsuoka, M. Nightingale, A. Rideout, L. Saint-Amant, P.J. Schmidt, A. Orr, S.S. Bottomley,

- M.D. Fleming, M. Ludman, S. Dyack, C.V. Fernandez, M.E. Samuels (2009) Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat. Genet.* 41, 651–653.
106. D.V. Miniero, A.R. Cappello, R. Curcio, A. Ludovico, L. Daddabbo, I. Stipani, A.J. Robinson, E.R. Kunji, F. Palmieri (2010) Functional and structural role of amino acid residues in the matrix alpha-helices, termini and cytosolic loops of the bovine mitochondrial oxoglutarate carrier. *Biochim Biophys Acta.* 1807, 302-10.
 107. M. Monné, D.V. Miniero, L. Daddabbo, A.J. Robinson, E.R. Kunji, F. Palmieri (2012) Substrate specificity of the two mitochondrial ornithine carriers can be swapped by single mutation in substrate binding site. *J Biol Chem.* 287, 7925-7934.
 108. R. Spiegel, A. Shaag, S. Edvardson, H. Mandel, P. Stepensky, S.A. Shalev, Y. Horovitz, O. Pines, O. Elpeleg (2009) SLC25A19 mutation as a cause of neuropathy and bilateral striatal necrosis. *Ann. Neurol.* 66, 419-424
 109. D.K. Bricker, E.B. Taylor, J.C. Schell, T. Orsak, A. Boutron, Y.C. Chen, J.E. Cox, C.M. Cardon, J.G. Van Vranken, N. Dephoure, C. Redin, S. Boudina, S.P. Gygi, M. Brivet, C.S. Thummel, J.A. Rutter (2012) Mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science.* 337, 96-100.
 110. F. Palmieri (2012) The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Molecular Aspects of Medicine.* En prensa.
 111. F. Molinari, A. Kaminska, G. Fiermonte, N. Boddaert, A. Raas-Rothschild, P. Plouin, L. Palmieri, F. Brunelle, F. Palmieri, O. Dulac, A. Munnich, L. Colleaux (2009) Mutations in the mitochondrial glutamate carrier SLC25A22 in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin Genet.* 76, 188-194.

ANEXO

TABLAS 1 Y 3

Tabla 1.- Familia de transportadores mitocondriales (MCF) SLC25.

GEN HUMANO	PROTEÍNA	Otro nombre	Sustratos predominantes	Tipo de transporte /iones acoplados	Distribución Tejidos, expresión celular/subcelular	Enfermedad asociada	Locus genét. humano	ID acceso secuencia	Variantes procesamiento y propiedades
SLC25A1	CIC (transportador de citrato)	CTP, transportador tricarboxilato SLC20A3	Citrato, isocitrato, malato, PEP	E/citrato-H ⁺ /malato	Hígado, riñón páncreas (también cerebro, pulmón, corazón) / MIM		22q11.21	NM_005984	
SLC25A2,	ORC2 (transportador de la ornitina 2)	ORNT2	ornitina, citrulina, lisina, arginina, histidina	E/ornitina/citrulina más H ⁺ ; ornitina/H ⁺	Hígado, testículos, bazo, páncreas, pulmón, intestino delgado, cerebro, riñón / MIM		5q31	NM_031947	
SLC25A3	PHC (transportador de fosfato)	PiC, PTP	Fosfato	C/fosfato más H ⁺ E/fosfato/OH ⁻	Isoforma A: corazón, músculo esquelético y diafragma; Isoforma B: hígado, riñón, cerebro, timo, pulmón, corazón, músculo esquelético, diafragma/ MIM	Deficiencia de transportador de fosfato mitocondrial	12q23.1	NM_005888 isoforma A NM_002635 isoforma B NM_001151	isoformas A y B generados por corte y empalme alternativo del exón IIIA o exón IIIB
SLC25A4,	ANT1 (Adenin nucleótido translocasa 1)	AAC 1, T1, PEO2, PEO3,	ADP, ATP	E/ADP/ATP	Corazón, músculo esquelético, mucho menos en cerebro, páncreas, próstata, riñón, pulmón, timo /MIM	Deficiencia de AAC1, ad(PEO); cardiomiopatía f. hipertrófica	4q35.1	NM_001151	
SLC25A5	ANT2 (Adenin nucleótido translocasa 2)	AAC 2, T2,	ADP, ATP	E/ADP/ATP	Cerebro, pulmón, riñón, páncreas, corazón, músculo esquelético, bazo /MIM		Xq24-X26	NM_001152	
SLC25A5P1	Pseudogen	bK250D10,ANTP 3					22q13.2	NG_009276	
SLC25A6	ANT3 (Adenin nucleótido translocasa 3)	AAC3, T3,	ADP, ATP	E/ADP/ATP	Cerebro, pulmón, riñón, hígado, páncreas, corazón, músculo esq., bazo, timo / MIM		Xp22.32	NM_001636	
SLC25A6P1	Pseudogen						20p11.22	NG_003127	
SLC25A7	UCP1, (proteína desacoplante 1)	Termogenina, transportador de protón.	H ⁺	F	Grasa parda/MIM	(obesidad)	4q28-q31	NM_021833.	
SLC25A8	UCP2, (proteína desacoplante 2)	Transportador de protón, UCPH	H ⁺	F	Pulmón, riñón, bazo, corazón /MIM	Obesidad, diabetes tipo 2 Hiperinsulinismo congénito	11q13	NM_003355	
SLC25A9	UCP3, (proteína desacoplante 3)	Transportador de protón	H ⁺	F	Músculo esquelético, pulmón / MIM	Obesidad diabetes tipo 2	11q13	NM_003356 NM_022803	2 variantes de corte.
SLC25A10	DIC (transportador de dicarboxilatos)		Malato, fosfato, succinato, sulfato, tiosulfato.	E/malato/fosfato	Hígado, riñón, corazón, cerebro, pulmón y páncreas /MIM		17q25.3	NM_012140.	
SLC25A11	OGC (transportador de oxoglutarato)	Transportador de oxoglutarato/ Malato SLC0A4	Oxoglutarato,malato	E/oxoglutarato/malato	Corazón, músculo esq., hígado, riñón, cerebro, páncreas / MIM		17p13.3	NM_003562.	
SLC25A12	AGC1 (transportador aspartato/glutamato1)	aralar 1	Aspartato, glutamato	E/aspartato/ glutamato+H ⁺	Cerebro, corazón, músculo esquelético, pulmón, páncreas, riñón, pero no en hígado / MIM	Deficiencia de AGC1 (autismo)	2q31.1	NM_003705.	
SLC25A13	AGC2 (transportador aspartato/glutamato2)	Citrina, CTLN2, aralar2	Aspartato, glutamato	E/aspartato/ glutamato+H ⁺	Hígado, riñón,páncreas, corazón, músculo esq., cerebro/ MIM	Citrulinaemia tipo II (CTLN2), colestasis intrahepática neonatal (NICCD)	7q21.3	NM_014251	
SLC25A14	UCP5 (proteína desacoplante 5)	BMCP1, Proteína transportadora mitocondrial del cerebro	O		Ampliamente expresada, con niveles más altos en cerebro y testículos		Xq24	NM_003951 NM_022810	2 variantes de corte.

GEN HUMANO	PROTEÍNA	Otro nombre	Sustratos predominantes	Tipo de transporte /iones acoplados	Distribución Tejidos, expresión celular/subcelular	Enfermedad asociada	Locus genético humano	ID acceso secuencia	Variantes de procesamiento y propiedades
SLC25A15	ORC1 (transportador de la ornitina 1)	ORNT1, HHH	Ornitina, citrulina, lisina, arginina	E / ornitina / citrulina+H ⁺ ; ornitina/H ⁺	Hígado, páncreas, pulmón, testículos, intestino delgado, bazo, riñón, cerebro, corazón /MIM	Síndrome HHH ⁶	13q14.11	NM_014252	
SLC25A15	Pseudogen						Yq11.223	NG_002817	
SLC25A16	GDC (transportador de la enfermedad de Graves)	GDA, ML7, HGT.1	O		Hígado, riñón, tiroides, pulmón, corazón, músculo esq. cerebro /MIM		10q21.3	NM_152707	
SLC25A17		PMP34, ANC1, ANT1	CoA,FAD, NAD ⁺ , AMP,ADP, PAP, dpCoA, FMN	E /CoA/PAP, CoA/dpCoA, CoA/AMP, FAD/FMN, NAD ⁺ /AMP	Cerebro, riñón, pulmón, corazón, hígado, pancreas/ Membrana Peroxisomal		22q13.2	NM_006358	
SLC25A18	GC2 (Transportador de glutamato 2)		Glutamato	C/glutamato + H ⁺ ; E/glutamato/OH ⁻	Cerebro, testículos, corazón, páncreas, riñón, pulmón /MIM		22q11.21	NM_031481	
SLC25A19	DNC (Transportador de deoxinucleótidos)	TPC, MUP1, MCPHA	ThPP, ThMP, (desoxi)nucleótidos	E /ThPP/ThMP, ThPP/(desoxi)nucl eótido,	Cerebro, testículos, pulmón, riñón, hígado, bazo, músculo esquelético, corazón / MIM	Microcefalia congénita de los Amish (MCPHA): Neuropatía con necrosis del estriado bilateral	17q25.3	NM_021734 NM_001126022 NM_001126121	Tres variantes: isoformas generadas por corte y empalme alternativo en el 5'-UTR
SLC25A20	CAC (Transportador carnitina /acilcarnitina)	CACT, Transportador de carnitina	Carnitina, acil-carnitinas	E/carnitine/acyl-carnitinas ; F (a baja velocidad)	Corazón, músculo esquel., hígado (también pulmón, riñón, cerebro, páncreas, placenta)/ MIM	Deficiencia de CAC	3p21.31	NM_000387	
SLC25A20P							6p12	NG_001087	
SLC25A21	ODC (Transporta-dor oxoadipato)		Oxoadipato, oxoglutarato	E/oxoadipato/ oxoglutarato	Riñón, vesícula biliar, colon, hígado, placenta, pulmón, testículos, bazo, músculo esq. cerebro, corazón./MIM		14q11.2	NM_030631	
SLC25A22	GC1, (Transporta-dor glutamato 1)		Glutamato	C/glutamato+ H ⁺ E/glutamato/OH ⁻	Páncreas, cerebro, hígado, testículos, bazo, riñón, corazón, pulmón, intestino delgado, células β–pancreas / MIM	Encefalopatía epiléptica precoz	11p15.5	NM_024698	
SLC25A23	APC2	ScaMC-3, MCSC2	ATP-Mg ²⁺ , ATP, ADP, AMP, Pi.	E/ATP-Mg/Pi	Riñón, pulmón, intestino delgado, páncreas, cerebro, hígado, músculo esq., corazón/MIM		19p13.3	NM_024103	
SLC25A24	APC1	ScaMC-1	ATP-Mg ²⁺ , ATP, ADP, AMP, Pi.	E/ATP-Mg/Pi	Testículos/MIM		1p13.3	NM_013386 NM_213651	2 variantes de corte.
SLC25A25	APC3	ScaMC-2, MCSC, PCSCL	O		Cerebro, corazón, músculo esq., hígado, intestino delgado, pulmón, páncreas, testículos/MIM		9q34.11	NM_052901 NM_001006641 NM_001006642 NM_001006643	4 variantes de corte.
SLC25A26	SAMC		S-adenosil-Met S-adenosil-Hcys	E/S-adenosil-Met./S-adenosil-Homocisteina	Ubicuo (testículos)/MIM		3p14.1	NM_173471	
SLC25A27	UCP4 (proteína desacoplante 4)		O		Cerebro /MIM		6p11.2-q.12	NM_004277	
SLC25A28	Mitoferrin 2. (Mfrn2)	MRS3/4; MRS4L	Fe ²⁺		Ubícuo (corazón, hígado, riñón)		10q23-q24	NM_31212	
SLC25A29	ORNT3	CACL	Ornitina, acil-carnitinas		Corazón, músculo esq., hígado, cerebro/MIM		14q32.2	NM_001039355	
SLC25A30		KMCP1, UCP6	O		Riñón		13q14.12	NM_001010875	

GEN HUMANO	PROTEÍNA	Otro nombre	Sustratos predominantes	Tipo de transporte /iones acoplados	Distribución Tejidos, expresión celular/subcelular	Enfermedad asociada	Locus genético humano	ID acceso secuencia	Variantes de procesmiento y propiedades
SLC25A31	AAC4, ANT4 (transportador 4 de adenin nucleótidos)	SFEC	ADP, ATP	E/ADP/ATP	Testículo	(espermatogénesis)	4q28.1	NM_031291	
SLC25A32	MFT	MFTC	Folato				8q23.3	NM_030780	
SLC25A33	PNC1, (transportador 1 de pirimidin nucleótidos)	BMSC-MCP	UTP		Ubicuo		1p36.22	NM_032315	
SLC25A34			O				1p36.21	NM_207348	
SLC25A35			O				17p13.1	NM_201520	
SLC25A36	PNC2, (transportador 2 de pirimidin nucleótidos)		Pirimidin nucleó-tidos				3q23	NM_018155	2 variantes de corte.
SLC25A37	Mitoferrina 1, (Mfrn1)	HTO15, MSC, MSCP	Fe ²⁺		Hígado fetal, médula ósea, bazo, placenta, hígado, cerebro		8p21.2	NM_016612	
SLC25A38			¿Glicina?		Células eritroides	Ane. sideroblástica	3p22.1	NM_017875	
SLC25A39		CGI-69	O		Ubicuo		17q12	NM_016016	2 variantes de corte.
SLC25A40		MCFP	O		Ubicuo a bajos niveles		7q21.12	NM_018843	
SLC25A41	APC4	SCaMC-3L	ATP/Mg/Pi;	E	Cerebro, testículos, hígado		19p13.3	NM_173637	
SLC25A42			CoA, ADP, ATP, adenosina 3',5'-difosfato, dpCoA	E	Ubicuo (tejido adiposo)/MIM		19p13.11	NM178526	
SLC25A43			O		Cerebro, glándula adrenal, músculo e.		Xq24	NM_145305	
SLC25A44			O		Ubicuo		1q22	NM_014655	2 variantes de corte.
SLC25A45			O		Músculo esq., intestino, cerebro, testículos		11q13.1	NM_182556	2 variantes de corte.
SLC25A46			O		Ubicuo		5q22.1	NM_138773	
SLC25A47		C14orf68, HDMCP	O				14q32.2	NM_207117.2	
SLC25A48		FLJ44862	O				5q31.1	NM_145282.2	
SLC25A49	MTCH1	MCH1	O				6pter-p24.1	NM_014341.1	
SLC25A50	MTCH2	MCH2	O				11p11.2	NM_0014342.3	
SLC25A51	MCART1	MCTR1	O				9p13.3-p12	NM_033412.3	
SLC25A51P1	Pseudogen	MCART3P							
SLC25A51P2	Pseudogen	MCART4P							
SLC25A51P3	Pseudogen	MCART5P							
SLC25A52	MCART2	MCTR2	O				18q12.1	NM_001034172.2	
SLC25A53	MCART6	MCTR6	O				Xq22.2	NM_00101012755.3	

C: cotransportador; E: intercambiador; F: transportador facilitado; O: transportador huérfano; adPEO: oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante; dpCoA: defosfo-coenzima-A; PAP: adenosina 3',5'-fosfato; PEP: fosfoenol piruvato. Genes con enfermedades asociadas en rojo; pseudogenes en morado.

Tabla 3.- Enfermedades causadas por mutaciones en genes nucleares que codifican MCs.

MC Transportador	Sustratos	Enfermedad-Fenotipo	n° MIM Fenotipo	Locus Gen	Localización citogenética	n° MIM Locus Gen
CAC	Carnitina/acilcarnitina	Deficiencia de CAC	212138	SLC25A20	3p21.31	613698
ORC1	Ornitina/citrulina	Síndrome HHH-Hiperornitinemia.hiperamonemia-homocitrulinemia	238970	SLC25A15	13q14.11	603861
AGC2	Aspartato/glutamato	Deficiencia de AGC2 (CTLN2/NICCD)	605814	SLCA2513	7q21.3	603859
AAC1	ADP/ATP	Oftalmoplejía externa crónica -autosómica dominante	609283	SLC25A4	4q35.1	103220
TPC	Pirofosfato de tiamina	Microcefalia congénita de los Amish	607196	SLC25A19	17q25.1	606521
GC1	Glutamato	Encefalopatía epiléptica precoz infantil	609304	SLC25A22	11p15.5	609302
AAC1	ADP/ATP	Deficiencia de AAC1-Cardiomiopatía familiar hipertrófica	192600	SLC25A4	4q35.1	103220
PiC	Fosfato	Deficiencia de PiC	610773	SLC25A3	12q23.1	600370
AGC1 (Aralar)	Aspartato/glutamato	Deficiencia de AGC1-Hipomielinización global cerebral	612949	SLC25A12	2q31.1	603667
TPC	Pirofosfato de tiamina	Degeneración bilateral del estriado-polineuropatía progresiva	613710	SLC25A19	17q25.1	606521
		Anemia (hipocrómica microcítica) con sideroblastos refractaria a piridoxina	205950	SLC25A38	3p22.1	610819

CAC transportador carnitina/acilcarnitina; **ORC1** transportador de ornitina tipo 1; **AGC2** transportador aspartato/glutamato isoforma 2; **AAC1** transportador ADP/ATP ; **TPC** transportador de pirofosfato de tiamina; **GC1** transportador de glutamato isoforma 1; **PiC** transportador de fosfato; **AGC1** transportador aspartato/glutamato isoforma 1; **(CTLN2/NICCD)** citrulinemia tipo II de aparición neonatal/colestasis intrahepática neonatal por deficiencia de citrina.

Base de datos fenotípicos y del gen MIM (Mendelian Inheritance in Man): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Para conocer las mutaciones conocidas hasta el momento entrar en la Base de Datos de Mutaciones de Genes Humanos HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/introduction.php?> introduciendo el número MIM Locus Gen